

# Die Funktionen des Monostickstoffmonoxides als terminaler Elektronenakzeptor, Inhibitor und Produkt der respiratorischen Nitritreduktion von *Pseudomonas perfectomarinus*

---

Kurt Frunzke

---

Dissertation

Erlangen 1983

1983 № 3 1 1



Digitized by the Internet Archive  
in 2026



**Die Funktionen des Monostickstoffmonoxides  
als terminaler Elektronenakzeptor, Inhibitor und  
Produkt der respiratorischen Nitritreduktion  
von *Pseudomonas perfectomarinus***

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg  
zur  
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt  
von  
Kurt Frunzke  
aus  
Erlangen

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaft-  
lichen Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung:

14. Juli 1983

Vorsitzender der Promotionskommission: Prof. Dr. K. Jacobs

Erstberichterstatter: Prof. Dr. W. Zumft

Zweitberichterstatter: Prof. Dr. E. Kessler

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. W.G. Zumft danke ich für die Anregung dieser Arbeit und für die stete Bereitschaft, mir durch eingehende Diskussionen und Vorschläge zur Seite zu stehen. Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. T. Matsubara, der mich an seiner langjährigen Erfahrung auf dem Gebiet der bakteriellen Denitrifikation teilhaben ließ.



# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Einleitung .....                                                                                                           | 1  |
| 1.1. Die bakterielle Denitrifikation im biologischen Stickstoffkreislauf .....                                                | 1  |
| 1.2. Biochemie der respiratorischen Nitratreduktion ....                                                                      | 8  |
| 2. Material und Methoden .....                                                                                                | 16 |
| 2.1. Organismen und Anzuchtbedingungen .....                                                                                  | 16 |
| 2.2. Präparative Methoden .....                                                                                               | 22 |
| 2.3. Analytische Methoden .....                                                                                               | 23 |
| 2.4. Gase und Chemikalien .....                                                                                               | 26 |
| 2.5. Entwicklung eines Gasanalysenverfahrens zur Bestimmung von $H_2$ , $N_2$ , $O_2$ , $NO$ , $CO$ , $CO_2$ und $N_2O$ ..... | 27 |
| 2.5.1. Spezifische Anforderungen .....                                                                                        | 27 |
| 2.5.2. Verfügbare Methoden .....                                                                                              | 28 |
| 2.5.3. Aufbau des Trennsystems .....                                                                                          | 30 |
| 2.5.3.1. Auswahl und Aktivierung der stationären Phasen .....                                                                 | 30 |
| 2.5.3.2. Funktion des Dreisäulensystems .....                                                                                 | 32 |
| 2.5.3.3. Detektion .....                                                                                                      | 35 |
| 2.5.3. Eichung und Gasanalyse .....                                                                                           | 37 |
| 3. Ergebnisse .....                                                                                                           | 41 |
| 3.1. Expression der Denitrifikationsenzyme .....                                                                              | 41 |
| 3.1.1. Terminale Elektronenakzeptoren als Induktions- und Repressionsfaktoren .....                                           | 41 |
| 3.1.2. Biphasisches Wachstum .....                                                                                            | 45 |
| 3.2. Hemmung der $N_2O$ -Reduktase durch $NO$ und $O_2$ .....                                                                 | 48 |
| 3.2.1. Sensitivitätsunterschiede gegenüber $NO$ .....                                                                         | 49 |
| 3.2.2. Reversible Umschaltung des Elektronenflusses von $N_2O$ auf $O_2$ .....                                                | 50 |
| 3.2.3. Reversible und irreversible $NO$ -Hemmung .....                                                                        | 53 |
| 3.2.4. Angriffspunkt der $NO$ -Hemmung .....                                                                                  | 57 |
| 3.2.5. Mechanismus der $NO$ -Hemmung .....                                                                                    | 58 |
| 3.3. Unvollständige Denitrifikation .....                                                                                     | 61 |

|                                                                                                        |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.4. Richtung des Elektronentransportes zur $N_2O$ -Reduktase von b-Cytochromen zu c-Cytochromen ..... | 64  |
| 3.5. Enzymatische und nicht-enzymatische Reduktion von NO zu $N_2O$ .....                              | 65  |
| 3.5.1. Charakterisierung der Fe/Ascorbat abhängigen NO-Reduktion .....                                 | 67  |
| 3.5.1.1. Wirkung verschiedener Puffersubstanzen .....                                                  | 67  |
| 3.5.1.2. pH Profile .....                                                                              | 68  |
| 3.5.1.3. Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion des NO Partialdruckes .....                             | 69  |
| 3.5.1.4. Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der Fe(II)-Konzentration .....                          | 70  |
| 3.5.1.5. Veränderung der spektralen Absorption der Reaktionsphase während der NO-Reduktion .....       | 71  |
| 3.5.1.6. Wirkung von Metallkomplexbildnern .....                                                       | 72  |
| 3.5.1.7. Stöchiometrie .....                                                                           | 74  |
| 3.5.1.8. Kinetik .....                                                                                 | 75  |
| 3.5.2. Kopplung der nicht-enzymatischen NO-Reduktion an einen enzymatischen NO Generator .....         | 77  |
| 3.5.3. Charakterisierung der membrangebundenen NO-Reduktase .....                                      | 80  |
| 3.5.3.1. Aktivität als Funktion des NO Partialdruckes .....                                            | 80  |
| 3.5.5.1. Wirkung von Metallkomplexbildnern .....                                                       | 81  |
| 3.5.4. Trennung der Fe/Ascorbat abhängigen von der physiologischen Aktivität .....                     | 82  |
| 3.5.5. Lokalisation und Anreicherung der dissimilatorischen NO-Reduktase .....                         | 83  |
| 4. Diskussion .....                                                                                    | 84  |
| 5. Zusammenfassung .....                                                                               | 100 |
| 6. Literaturverzeichnis .....                                                                          | 102 |

## 1. EINLEITUNG

Eine Konsequenz des menschlichen Einflusses auf globale, biologische Prozesse stellt die Veränderung des Stickstoffkreislaufes der Biosphäre dar. Ansteigende Nitratkonzentrationen in Böden, Grundwasser und Binnengewässern sowie zunehmende Distickstoffmonoxid- und Ammoniakkonzentrationen in der Erdatmosphäre belegen dies (Delwiche, 1981).

### 1.1. DIE BAKTERIELLE DENITRIFIKATION IM BIOLOGISCHEN STICKSTOFFKREISLAUF

Eine schematische Darstellung des biologischen Stickstoffkreislaufes einschließlich zweier bedeutender industrieller Prozesse, wurde in Abhängigkeit von den Oxidationszahlen der N-Atome der beteiligten Stickstoffverbindungen erstellt (Abb. 1). Über 99 % der gesamten Stickstoffvorräte der Biosphäre (etwa  $3.9 \cdot 10^{21}$  g) liegen als gasförmiger Distickstoff in der Erdatmosphäre vor. Bleiben die noch um ein Vielfaches größeren, chemisch in der Lithosphäre gebundenen Stickstofflager, die nur in sehr begrenztem Umfang mit der Biosphäre austauschen, unberücksichtigt, so stellt der Luftstickstoff den mit Abstand größten Pool innerhalb des Gesamtkreislaufes dar (Delwiche, 1981). Die pro Jahr aus diesem Pool durch biologische Fixierung abgezogene Stickstoffmenge beträgt nur ca.  $1.5 \cdot 10^{14}$  g, wobei noch die durch industrielle Prozesse entnommenen

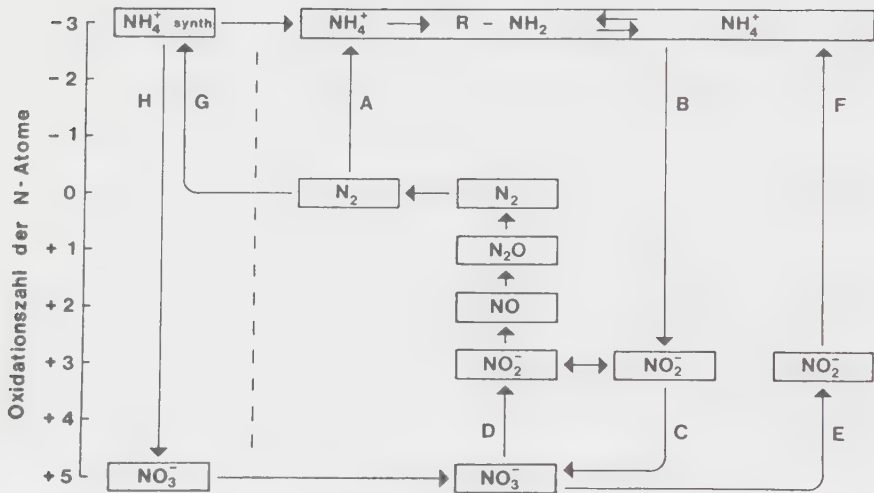


Abb. 1 Der Stickstoffkreislauf der Biosphäre

Die Pools sind als Funktion der Oxidationszahlen der darin enthaltenen N-Atome angeordnet. Übergangszustände und Pools, deren Existenz nicht feststeht, wurden nicht berücksichtigt. Abwärts weisende Pfeile symbolisieren Oxidationsvorgänge, nach oben gerichtete stehen für Reduktionen. Übergänge finden nur in Pfeilrichtung statt. Austauschprozesse ohne Veränderung des Oxidationszustandes sind durch waagrechte Pfeile dargestellt. Zwei bedeutende industrielle Prozesse, die in den Stickstoffkreislauf eingreifen sind links von der unterbrochenen Linie mit einbezogen worden.

A: Biologische  $\text{N}_2$  Fixierung; B: Nitrifikation durch Nitrosobakterien; C: Nitrifikation durch Nitrobakterien; D: Nitratatumung und Denitrifikation; E: Assimilatorische Nitratreduktion; F: Assimilatorische Nitritreduktion; G: Ammoniaxsynthese aus Luftstickstoff (Haber-Bosch Synthese); H: Katalytische Ammoniakverbrennung (Ostwald Verfahren).

Anteile von jährlich etwa  $5.6 \cdot 10^{13}$  g addiert werden müssen (Hardy und Hawelka, 1975). Durch Nitrifikation, d. h. durch biologische Oxidation von Ammonium zu Nitrat und dissimilatorische Nitratreduktion zu Distickstoff erfolgt die Rückführung in den atmosphärischen Pool.

Die Reaktionsschritte der dissimilatorischen Nitratreduktion, die gasförmige, stickstoffhaltige Substanzen produzieren, werden zusammen definitionsgemäß als bakterielle Denitrifikation bezeichnet (Gayon und Dupetit, 1886).



Die ökologische Konsequenz ist demnach der Verlust von gebundenem Stickstoff. Die physiologische Folge ist die Gewinnung von ATP durch respiratorische, membran-gebundene Phosphorylierung.

Die assimilatorische Reduktion von Nitrat zu Ammoniak ist hinsichtlich ihrer Verbreitung, der beteiligten Enzym- und Elektronencarriersysteme, sowie ihrer physiologischen Bedeutung klar von der Nitratrespiration zu unterscheiden (Pichinoty et al., 1969; Kessler, 1971; Zumft und Cárdenas, 1979).

In einigen Fällen konnte beobachtet werden, daß die oxidative Nitrifikation durch Nitrosobakterien nicht bis zum Nitrit erfolgt, sondern nur über vier Oxidationsstufen bis zum Distickstoffmonoxid, das von diesen Organismen nicht veratmet werden kann und deshalb an die Umgebung entweicht (Bremner und Blackmer, 1978, Yordy und Ruoff, 1981).

Es liegen Hinweise vor, die den Schluß zulassen, daß einige Bodenbakterien durch dissimilatorische Nitratreduktion nicht nur Distickstoff, sondern auch Ammoniak produzieren können (Bremner und Blackmer, 1981). Der Nachweis, daß es sich hierbei jedoch nicht um Überlagerungen dissimilatorischer und assimilatorischer Reduktionen handelt, konnte bisher nicht erbracht werden.

Seit 1940 ist der Bedarf an stickstoffhaltigen Düngemitteln weltweit von  $5 \cdot 10^6$  t auf über das Zehnfache dieser Menge angestiegen (Delwiche, 1981). Unter hohem Energieaufwand wird der überwiegende Teil dieser künstlichen Düngemittel nach dem Haber-Bosch Verfahren als Ammoniak aus Luftstickstoff gewonnen und teilweise durch katalytische Ammoniakverbrennung (Ostwald Verfahren) zu Nitrat oxidiert. Nach übereinstimmenden Schätzungen dürften weltweit durch bakterielle Denitrifikation zwischen 20 % und 30 % der landwirtschaftlich eingesetzten Nitratdüngemittel verloren gehen (Broadbent und Carlton, 1978; Allison, 1966; Rolston, 1981). Im Extremfall kann die Verlustrate bis auf 75 % ansteigen (Rolston et al., 1978). Die Verwendung von Ammoniumdüngern anstelle von nitrathaltigen kann diese Denitrifikationsverluste nur in begrenztem Umfang reduzieren. Abgesehen vom Problem der Bodenansäuerung durch Ammoniumaufnahme der Pflanzen, leben nitrifizierende und denitrifizierende Organismen trotz unterschiedlicher Ansprüche praktisch stets vergesellschaftet. In vielen Biotopen wird deshalb das in den oberen, besser durchlüfteten Bodenschichten von Nitrifizierern erzeugte Nitrat von denitrifizierenden Bodenbakterien zu Stickstoff veratmet.

Ein Teil des dissimilatorisch reduzierten Nitrates wird abhängig von verschiedenen Bedingungen des Biotopes und der Zusammensetzung der Mikroflora nicht als Distickstoff, sondern schon als Distickstoffmonoxid an die

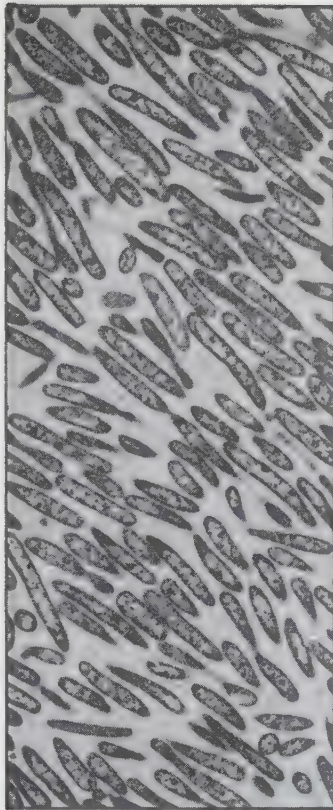
Atmosphäre abgegeben. Als Folge des zunehmenden Einsatzes von künstlichen, nitrathaltigen Düngemitteln erhöhte sich deshalb weltweit die atmosphärische Distickstoffmonoxidkonzentration (Crutzen, 1981). Es gilt nach den bisher erlangten Erkenntnissen als wahrscheinlich, daß Distickstoffmonoxid mit verantwortlich ist für Veränderungen in der vertikalen Ozonverteilung innerhalb der Stratosphäre als auch für das Absinken der Gesamtmenge des Ozons in der Erdatmosphäre (Crutzen, 1981). Neuerdings verdichten sich die Hinweise auf eine Beteiligung von Monostickstoffmonoxid und Distickstoffmonoxid an der Entstehung des sog. sauren Regens (Brimblecombe und Stedman, 1982). Nach photochemisch initiierten Oxidationsprozessen soll dabei aus beiden Stickstoffoxiden in höheren Atmosphärenschichten Salpetersäure gebildet werden (Crutzen, 1981).

Biotechnologische Verfahren werden in zunehmendem Maße zur Reinigung stickstoffbelasteter Industrie- und Haushaltsabwässer herangezogen. Höhere Leistung bei gleichzeitig verringerten Betriebskosten sind die Vorteile gegenüber den älteren chemischen und physikalischen Methoden (Schroeder, 1981). Da die Stickstoffverunreinigungen überwiegend in organisch gebundener Form oder als Ammonium vorliegen, werden in der Regel wenigstens zwei aufeinanderfolgende Stufen benötigt: In der ersten, aeroben Stufe wird der organisch gebundene Stickstoff durch bakterielle Degradationsprozesse als Ammonium freigesetzt und gleichzeitig durch Nitrifizierer zu Nitrat oxidiert. Denitrifikation und Freisetzung von Distickstoff erfolgen in einer zweiten, anaeroben Stufe (Schroeder, 1981).

Die überwiegende Zahl der bisher bekannten, denitrifizierenden Organismen sind fakultativ anaerobe, chemoorganoheterotrophe Bakterien. Bei Cyanobakterien und Eukaryonten konnte diese Form der anaeroben Atmung bisher nicht

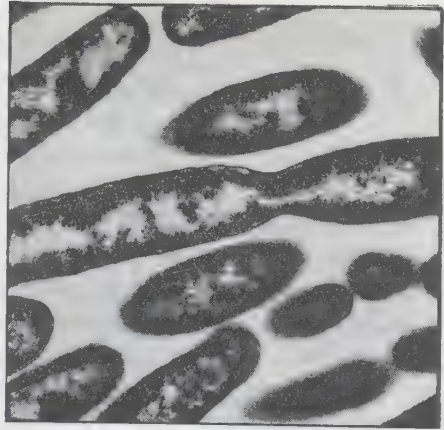
beobachtet werden. Einige Ausnahmen von der o. g. Gruppe bilden der chemolithotrophe Thiobacillus denitrificans (Hutchinson, 1973), das obligat anaerobe, ebenfalls chemolithotrophe Thiomicrospira denitrificans (Timmer-Ten Hoor, 1975). Einige Stämme des photosynthetischen Rhodospseudomonas sphaeroides sind ebenfalls zur Denitrifikation befähigt (Satoh et al., 1976). Es konnte sogar gezeigt werden, daß ein Vertreter dieser Spezies den durch Denitrifikation produzierten Stickstoff zu fixieren vermag (Dunstan et al., 1982). Nicht alle Denitrifizierer besitzen die Enzymausstattung zur Durchführung der gesamten Reaktionssequenz vom Nitrat bis zum Stickstoff. Viele Stämme der Gattung Neisseria reduzieren Nitrit, jedoch nicht Nitrat (Berger, 1961), während Escherichia coli die Nitratatmung auf der Stufe des Nitrits beendet (Haddock und Kendall-Tobias, 1975). Das Stickstoff fixierende Azospirillum kann  $N_2O$  nicht weiter reduzieren (Neyra et al., 1977). Die Beendigung der Nitratatmung mit  $N_2O$  wurde auch an Corynebacterium nephridii beobachtet (Renner und Becker, 1969). An der Gattung Halobacterium konnte erstmalig für Archaeobakterien dissimilatorische Nitratreduktion nachgewiesen werden (Werber und Mevarech, 1978). Es wird deutlich, daß die Fähigkeit zur Denitrifikation innerhalb der Prokaryonten mit Ausnahme der Cyanobakterien in vielen, taxonomisch weit voneinander entfernten Gruppen bis hin zu den Archaeobakterien anzutreffen ist (Ingraham, 1981).

Die Untersuchungen für die vorliegende Arbeit wurden an Vertretern der Gattung Pseudomonas durchgeführt und hiervon zum überwiegenden Teil an Pseudomonas perfectomarinus. Das bipolar begeißelte, marine, gram-negative Bakterium wurde von ZoBell und Upham (1944) isoliert und charakterisiert. Neuere Untersuchungen über Stoffwechselleistungen und Substratverwertung dieses Prokaryonten ergaben weitgehende Übereinstimmungen mit dem Verhalten der Stutzeri-Gruppe (Zumft und Döhler, unveröffentlicht).



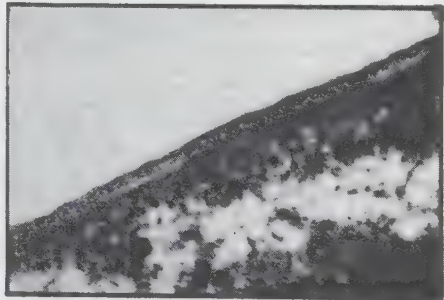
A

2 μm



B

1 μm



C

0.1 μm

Abb. 2 Pseudomonas perfectomarinus

Ein Zellpellet wurde in Glutaraldehyd fixiert, mit Osmium kontrastiert und in Epoxidharz eingebettet. Die Abbildung zeigt Transmissionaufnahmen dieses Präparates. 2A: In der Übersichtsaufnahme ist die für Pseudomonaden typische Stäbchenform zu erkennen. 2B: Frühes Zellteilungsstadium. Aus der Verteilung der ribosomenreichen (dunklen) und ribosomenarmen (hellen) Plasmabereiche ist zu entnehmen, daß die entstehenden Tochterzellen noch nicht durch eine Cytoplasmamembran voneinander getrennt sind. Beide stehen noch über einen gemeinsamen, ribosomenarmen Plasmaschlauch miteinander in Verbindung. 2C: Querschnitt durch Zellwand und Cytoplasmamembran. (EM Aufnahmen von R. Blank)

## 1.2. BIOCHEMIE DER RESPIRATORISCHEN NITRATREDUKTION

Von allen an der Nitratrespiration beteiligten Enzymsystemen wurde die Nitratreduktase am eingehendsten charakterisiert (Stouthamer, 1976). Es handelt sich um ein Molybdän-Eisen Protein, das säurelabilen Schwefel enthält. In Abhängigkeit von der Isolationsmethode der membrangebundenen dimeren Komplexe wurden unterschiedliche Molekulargewichte von stets mehr als 200 000 Dalton bestimmt (McGregor et al., 1974; Forget, 1974; Enoch und Lester, 1974; McGregor, 1976). Auch aus dem strikt anaeroben Propionibacterium acidipropionici konnte eine respiratorische Nitratreduktase isoliert werden (Kaneko und Ishimoto, 1978). NADH und Formiat wurden als Elektronendonoren, Flavoproteine, Ubichinon und Cytochrome vom b-Typ als Elektronencarrier identifiziert (Boogerd et al., 1980; Porte und Vignais, 1980). Die Nitratrespiration ist stets an die Entstehung eines Protonengradienten gekoppelt (John, 1977; Kristjansson et al., 1978). Dies konnte quantitativ durch Protonengradientenmessungen und Bestimmung des  $\text{PO}_4^{3-}/\text{e}^-$  Verhältnisses an zellfreien Systemen nachgewiesen werden (John, 1977; Yamanaka et al., 1962) und ergibt sich auch aus Wachstumsversuchen unter Sauerstoffausschluß mit Nitrat als einzig verfügbarem Elektronenakzeptor (Koike und Hattori, 1975).

Die dissimilatorische Nitritreduktion stellt definitionsgemäß den ersten Schritt der Denitrifikationssequenz dar. Anders als bei den bisher untersuchten Nitratreduktasen wurden zwei völlig unterschiedliche Typen von Nitritreduktasen isoliert und charakterisiert. Ein grünes, dimeres Cytochrom mit je einem c- und einem d-Häm in jeder der beiden identischen Untereinheiten wurde aus Pseudomonas aeruginosa von Horio et al. (1961) isoliert. Zunächst hatte man nur die Funktion dieses Proteins als Cytochrom-

oxidase erkannt und erst einige Jahre später gelang es Yamanaka (1964) deren Eigenschaft als Nitritreduktase aufzuzeigen. In zahlreichen Denitrifizierern wurden Enzyme des gleichen Typs entdeckt und isoliert (Lam und Nicholas, 1969; Newton, 1969; Iwasaki und Matsubara, 1971; Le Gall et al., 1979). Die Molekulargewichte liegen zwischen 85 000 und 125 000 Dalton. Azurin, ein im oxidierten Zustand blaues, Cu-haltiges Protein und Cytochrom  $c_{551}$  konnten als direkte Elektronendonoren identifiziert werden. An gereinigtem Cytochrom cd aus Pseudomonas aeruginosa (Shimada und Oori, 1976) und Thiobacillus denitrificans (Sawhney und Nicholas, 1978) wurde die gleiche Richtung des Elektronenflusses vom c-Häm zum d-Häm festgestellt. Unter aeroben Bedingungen nimmt Sauerstoff anstelle von Nitrit die Funktion des terminalen Elektronenakzeptors ein.

Alle bisher untersuchten cd-Cytochrome reduzieren Nitrit in vitro überwiegend nur bis zum NO. Die vergleichsweise nur geringen  $N_2O$  Anteile des Reaktionsproduktes nehmen mit fortschreitender Reinigung der Enzyme stetig ab. Eine Ausnahme hiervon bildet die Nitritreduktase aus Pseudomonas aeruginosa, die in Gegenwart von FMN, NADH, Menadion und Cytochrom  $c_{551}$  die Reduktion von Nitrit und NO zu  $N_2O$  katalysiert (Wharton und Weintraub, 1980).

Cu-haltige, grün bis blau gefärbte Flavoproteine mit Molekulargewichten zwischen 60 000 und 70 000 Dalton repräsentieren den zweiten Typ der bisher bekannten dissimilatorischen Nitritreduktasen. Dieses Protein wurde aus Achromobacter cycloclastes (Iwasaki und Matsubara, 1972), aus verschiedenen Alcaligenes Stämmen (Matsubara, 1970; Kakutani et al., 1980) und aus Rhodopseudomonas sphaeroides (Sawada et al., 1978) isoliert. Ein c-Cytochrom wurde als physiologischer Elektronendonator in Betracht gezogen (Matsubara, 1970).

Ebenso wie Cytochrom cd reduzieren auch die Cu-haltigen Enzyme Nitritanionen zu NO. Während die Nitritreduktion durch Cytochrom cd in Gegenwart von Hydroxylamin gehemmt wird, katalysiert das Cu-Protein die Bildung von  $N_2O$  aus diesen beiden Stickstoffverbindungen. Aus physiologischer Sicht kommt dieser Reaktion sehr wahrscheinlich keinerlei Bedeutung zu (Matsubara, 1970). Die Addition von Hydroxylamin zu Nitritreduktase Ansätzen bietet jedoch die Möglichkeit eines qualitativen Tests, zur Unterscheidung zwischen Cytochrom cd und Cu-Protein in ganzen Zellen und Rohfraktionen (Matsubara, unveröffentlicht). Anders als die beiden Enzyme in gereinigter Form, reduzieren Membranfraktionen aus Pseudomonas perfectomarinus, ein Cytochrom cd-haltiger Denitrifizierer, sowohl Nitrit als auch NO mit Ascorbat und Phenazinmethosulfat als künstliche Elektronendonoren quantitativ zu  $N_2O$  (Zumft und Vega, 1979).

Der Nachweis, daß die dissimilatorische Nitritreduktion an Phosphorylierungsreaktionen gekoppelt ist konnte für die Cytochrom cd-haltigen Organismen Pseudomonas aeruginosa (Yamanaka, 1964), Paracoccus denitrificans (van Verseveld et al., 1977) Pseudomonas denitrificans (Koike und Hattori, 1975) u. a. erbracht werden. Für Bakterien mit Cu-haltiger Nitritreduktase steht der Beweis noch aus.

Obwohl mehrere Untersuchungen über die Eigenschaften dissimilatorischer NO Reduktasen durchgeführt wurden, gelang es bisher nicht, dieses Enzym zu isolieren. Partiiell angereicherte NO Reduktasekomplexe wurden aus Pseudomonas stutzeri (Chung und Najjar, 1956), aus Pseudomonas aeruginosa (Fewson und Nicholas, 1960), aus Alcaligenes sp. (Miyata et al., 1969), aus Alcaligenes faecalis (Matsubara und Iwasaki, 1972) und aus Pseudomonas perfectomarinus (Cox and Payne, 1973; Zumft und Vega, 1979) ge-

wonnen. Die spezifischen Aktivitäten dieser Fraktionen unterscheiden sich jedoch nur geringfügig von denjenigen der intakten Bakterienzellen. Dies ist nur zum Teil auf zu geringe Anreicherung zurückzuführen, sondern vor allem auf unterschiedlich hohe Aktivitätsverluste während des Zellaufschlusses und der ersten Reinigungsschritte.

Die bisher vorliegenden Daten über Eigenschaften und Funktionsweise der NO Reduktasesysteme ergeben noch kein einheitliches Bild (Bryan, 1981; Payne, 1981). Während in Pseudomonas perfectomarinus und Alcaligenes faecalis die katalytische Aktivität fast ausschließlich in Partikelfractionen vorlag, wurden die aktiven Fraktionen aus Pseudomonas stutzeri und Pseudomonas aeruginosa durch Ammoniumsulfatfällung aus Zentrifugationsüberständen erhalten. Über die Natur und Funktion der physiologischen Elektronendonoren herrscht Unklarheit. Ascorbat und PMS erwiesen sich als geeignetes, künstliches Elektronendonsystem für die membrangebundene NO Reduktase in Alcaligenes faecalis (Matsubara und Iwasaki, 1971), in Alcaligenes sp. (Miyata, 1971) und Pseudomonas perfectomarinus (Zumft und Vega, 1979; Zumft und Frunzke, 1982). Ein zunächst nicht identifiziertes, NO bindendes Protein mit Maxima bei 542 nm und 573 nm im Differenzspektrum (Rowe et al., 1977) erwies sich später als Redox-übergangszustand von Cytochrom cd während der Nitritreduktion (Zumft et al., 1979).

Von großem Interesse ist die bisher nicht geklärte Frage, ob NO ein Intermediärprodukt der bakteriellen Denitrifikation darstellt. Da nur in wenigen Organismen während der Nitritdissimilation unter bestimmten Bedingungen NO Produktion nachgewiesen werden konnte (Renner und Becker, 1970), andererseits aber die Mehrzahl der Denitrifizierer NO zu  $N_2O$  oder  $N_2$  reduzieren kann, werden folgende Reaktionsschemata diskutiert:



Im Gegensatz zum NO gilt die Stellung des  $N_2O$  als Intermediärprodukt der bakteriellen Denitrifikation als gesichert, wenngleich auch Letzteres nur unter bestimmten Bedingungen freigesetzt wird. Unter der Einwirkung spezifischer Hemmstoffe wie z. B. Acetylen (Yoshinari und Knowles, 1976),  $CuSO_4$ , Monojodacetat, Azid und 2,4-Dinitrophenol (Matsubara und Mori, 1968) wird die Nitritrespiration bereits vorzeitig auf der Stufe des  $N_2O$  beendet und dieses anstelle von  $N_2$  ausgestoßen. Mit Hilfe eines Radioisotopenexperimentes wurde die Rolle des  $N_2O$  als Zwischenprodukt der Denitrifikation bestätigt (St. John und Hollocher, 1977): In einem Pool aus  $^{14,14}N_2O$  konnte  $^{15}N$  aus  $^{15}NO_2^-$  quantitativ verfolgt werden. Die Bildungsrate von  $^{15,15}N_2$  war direkt proportional zur  $^{15,15}N_2O$  Konzentration im  $N_2O$  Pool. Würde eine Bypass-Reaktion um das  $N_2O$ , d. h. eine direkte Reduktion von  $NO_2^-$  zu  $N_2$  ohne das Zwischenprodukt  $N_2O$  existieren, so wäre der  $N_2$  Pool zusätzlich durch  $^{15}NO_2^-$  aufgefüllt worden und die Bildung von  $^{15,15}N_2$  hätte in diesem Fall nicht 1. Ordnung, sondern zwischen 0. und 1. Ordnung in Bezug auf  $^{15,15}N_2O$  sein müssen.

An Zellen von Alcaligenes sp. (Matsubara und Mori, 1968; Matsubara, 1971), Alcaligenes faecalis (Matsubara und Iwasaki, 1971), Pseudomonas aeruginosa und Paracoccus denitrificans (Sidransky et al., 1978), Pseudomonas perfectomarinus, Pseudomonas aeruginosa und Micrococcus denitrificans (Yoshinari und Knowles, 1976) wurden wichtige Eigenschaften der  $N_2O$  Reduktase wie z. B. Sensitivität gegenüber bestimmten Hemmstoffen, Kinetik der Substratreduktion und die Funktion verschiedener physiologischer Elektronendonoren untersucht. Für Paracoccus denitrificans (Boogerd et al., 1980) und für Alcaligenes sp. (Matsubara, 1975) konnte mittels Differenzspektrophotometrie nachgewiesen werden, daß sowohl b-Cytochrome als auch c-Cytochrome

als Elektronencarrier für die  $N_2O$ -Reduktase dienen. Auf Grund der extremen Instabilität der  $N_2O$ -Reduktase in zellfreien Extrakten, scheiterten zahlreiche Versuche dieses Enzym auf direktem Weg zu isolieren (Matsubara und Mori, 1968; Kristjansson und Hollocher, 1980; Payne et al., 1971; Frunzke und Zumft, unveröffentlicht). Mit Hilfe der indirekten Methode von Wachstumsversuchen in Medien, denen bestimmte Zwischengruppenmetalle entzogen worden waren, gelang der Nachweis, daß Kupfer ein essentieller Faktor für die  $N_2O$ -Reduktasekomplexe in zwei Alcaligenes Arten (Iwasaki et al., 1980) und in Pseudomonas perfectomarinus ist (Matsubara et al., 1982). Aus Pseudomonas perfectomarinus wurde die  $N_2O$ -Reduktase isoliert und bis zur Homogenität gereinigt (Zumft und Matsubara, 1982). Das dimere Enzym besteht aus zwei gleich großen Untereinheiten, besitzt ein Molekulargewicht von 120 000 Dalton und enthält 8 Cu Atome.

Ebenso wie die Nitrat- und Nitritrespiration ist auch die dissimilatorische  $N_2O$ -Reduktion über die Ausbildung eines Protonengradienten an membrangebundene Phosphorylierungsreaktionen gekoppelt (Koike und Hattori, 1975a). Dies folgt ebenso aus der Tatsache, daß die meisten denitrifizierenden Bakterien, die fermentativ kein ATP bilden können unter anaeroben Bedingungen mit  $N_2O$  als Elektronenakzeptor wachsen.

Über die Regulationsmechanismen, die die Synthese der Denitrifikationsenzyme steuern liegen bisher nur wenige gesicherte Erkenntnisse vor. Zentrale Funktion wird der  $O_2$  Repression und der Induktion durch Nitrat zugesprochen (Downey, 1966; Schulp und Stouthamer, 1970; Matsubara, 1970; Payne et al., 1971).

Aus einigen älteren Untersuchungen kann indirekt eine Hemmwirkung des NO auf die  $N_2O$ -Reduktase abgeleitet werden. Intakte Zellen eines Alcaligenes Stammes, die mit  $N_2O$  als Elektronenakzeptor angezogen worden waren, reduzier-

ten Nitrit nur bis zum  $N_2O$  (Matsubara, 1971) und Alcaligenes faecalis Suspensionen beendeten die NO-Reduktion mit der Freisetzung von  $N_2O$  (Matsubara und Iwasaki, 1971). Aus der Beobachtung, daß Extrakte aus Pseudomonas perfectomarinus, die nach den Angaben der Autoren  $N_2O$  zu  $N_2$  reduzieren, eine lag Phase von 60 min benötigten, um NO zu  $N_2$  zu reduzieren, folgerten Payne et al. (1971), daß die  $N_2O$ -Reduktion supprimiert würde, wenn NO im Überschuß neben geringen Mengen an  $N_2O$  vorliege.

Die vorliegende Arbeit versucht verschiedene Funktionen des NO in der bakteriellen Denitrifikation darzustellen und zu klären. Erkenntnisse über Induktionsbedingungen der dissimilatorischen NO-Reduktase und über die hier erstmals charakterisierte Hemmung der  $N_2O$ -Reduktion durch NO werden zur Diskussion gestellt. Es erfolgen Hinweise auf physiologische und ökologische Konsequenzen dieser Ergebnisse. Über Eigenschaften der enzymatischen und einer nicht enzymatischen,  $Fe^{2+}$  und Ascorbat abhängigen NO-Reduktion wird berichtet. Der Fe/Ascorbatkomplex wird als Modellsystem für die katalytische Entstehung der N-N Bindung dargestellt und diskutiert.

Die Entwicklung und Leistung eines schaltbaren gaschromatographischen Mehrsäulentrennsystemes, das für kinetische Untersuchungen zur simultanen und schnellen Analyse von  $O_2$ ,  $N_2$ , NO,  $N_2O$  und  $CO_2$  benötigt wurde, wird im methodischen Teil dieser Arbeit beschrieben.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. ORGANISMEN UND ANZUCHTBEDINGUNGEN

|                                           |                                                  |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| <u>Pseudomonas</u> <u>perfectomarinus</u> | ATCC 14 405                                      |
| <u>Pseudomonas</u> <u>stutzeri</u>        | JM 300<br>(erhält demnächst eine<br>ATCC Nummer) |
| <u>Pseudomonas</u> <u>fluorescens</u>     | Biotype B, PJ 187<br>(ICPB 2 708-401)            |
| <u>Pseudomonas</u> <u>fluorescens</u>     | Biotype B, PJ 188<br>(ICPB 2 928-402)            |
| <u>Pseudomonas</u> <u>fluorescens</u>     | Biotype C, DSM 50 111                            |
| <u>Pseudomonas</u> <u>chlororaphis</u>    | B 560 (ICPB 2 712-30)                            |
| <u>Pseudomonas</u> <u>chlororaphis</u>    | B 561 (ICPB 2 713-31)                            |
| <u>Pseudomonas</u> <u>aureofaciens</u>    | ATCC 13 985                                      |

## Anzuchtmedien

Um hohe Zellausbeuten zur Isolierung von Membranfraktionen zu erhalten wurde Pseudomonas perfectomarinus in einem Vollmedium mit folgender Zusammensetzung angezogen (Zumft und Frunzke, 1982):

| Komponente (*)                                    | Konzentration<br>(g · l <sup>-1</sup> ) |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| NaCl reinst                                       | 15.0                                    |
| MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O reinst     | 5.0                                     |
| KCl p. A.                                         | 1.0                                     |
| Na <sub>3</sub> Citrat · 2 H <sub>2</sub> O p. A. | 0.250                                   |
| FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O p. A.      | 0.025                                   |
| CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O p. A.      | 0.8                                     |
| Trypton (Difco)                                   | 5.0                                     |
| Hefeextrakt (Merck)                               | 1.5                                     |
| NaNO <sub>3</sub> p. A.                           | 1.0                                     |

(\*) Der pH des Mediums wurde vor dem Autoklavieren mit 10 N NaOH auf 6.8 eingestellt.

Für Untersuchungen zur Induktion der terminalen Oxidasen der Denitrifikation wurde im weiteren Verlauf der Arbeit nur noch synthetisches Medium verwendet, da die Kontamination vor allem von Trypton und Hefeextrakt mit Nitrat oder Nitrit nicht ausgeschlossen werden konnte. Alle für diese Arbeit benötigten Bakterienstämme wurden in gleichen Mineralmedium mit Asparagin und Citrat als N- und C-Quellen angezogen (Matsubara et al., 1982):

| Komponente (1)                                             | Konzentration<br>(g · l <sup>-1</sup> ) |
|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| NaCl reinst (2)                                            | 20.0                                    |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O reinst               | 4.0                                     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> p. A.                      | 2.0                                     |
| CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O p. A.               | 0.20                                    |
| Na <sub>3</sub> Citrat · 2 H <sub>2</sub> O reinst (Merck) | 7.0                                     |
| L-Asparagin reinst (Merck)                                 | 2.0                                     |
| FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O p. A.               | 0.025                                   |
| NaNO <sub>3</sub> p. A. (3)                                | 1.0                                     |

- (1) Der pH des fertigen Mediums wurde vor der Sterilisation mit 10 N NaOH auf 6.8 eingestellt.
- (2) NaCl wurde nur zur Anzucht von Ps. perfectomarinus zugesetzt und für alle anderen Organismen ersatzlos weggelassen.
- (3) NaNO<sub>3</sub> wurde nur dort zugegeben, wo dies ausdrücklich vermerkt ist.

#### Cu-freies Anzuchtmedium

Zur Herstellung von Cu-freiem, synthetischen Medium wurde die Methode von Matsubara et al., (1982) herangezogen. Mit Ausnahme von L-Asparagin wurden nur Chemikalien von p. A. Qualität verwendet. Alle Glasgefäße, die zur Herstellung oder Verwendung dieses Mediums benutzt wurden, wurden mit heißer 10 N KOH und anschließend mit konzentrierter Salpetersäure behandelt. Zehnfach konzentriertes Medium ohne NaCl und zehnfach konzentrierte NaCl Lösung (200 g · l<sup>-1</sup>) wurden parallel und unmittelbar vor Gebrauch bei pH 6.6 mit 20 mg 1,5-Diphenylthiocarbazon (Dithizon) pro Liter Konzen-

trierter Lösung versetzt und 2 h lang kräftig gerührt. Danach wurde ungelöstes Dithizon abfiltriert. Durch dreimalige Extraktion mit je 100 ml Chloroform wurden Dithizonate und überschüssiges Dithizon entfernt. Nachdem entsprechende Volumina der konzentrierten Lösungen vereinigt und bis zur benötigten Endkonzentration verdünnt worden waren, wurde die Dithizonbehandlung wiederholt. Das gebrauchsfertige Medium enthielt danach weniger als 50 µg Cu/ml.

#### Großanzucht von Pseudomonas perfectomarinus

Für die Präparation von Membranfraktionen wurde Pseudomonas perfectomarinus in 20 l Kulturgefäßen angezogen. Um in kurzer Zeit hohe Zellausbeuten zu erhalten, wurde das Komplexmedium verwendet. Aus den Medienansätzen wurde für die Vorkulturen je 1 l aus 20 l entnommen. Die Vorkulturen wurden mit je fünf Impfösen voll Bakterien aus Agarschrägröhrchen inokuliert und bei 30 °C und 120 rpm im Schüttler inkubiert. Die Hauptkulturen wurden beginnend mit einer aeroben Phase im 6 h Rhythmus alternierend mit Luft begast ( $300 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ) und anaerob gehalten. Nach 23 h Wachstum bei 30 °C erfolgte während der letzten, anaeroben Phase die Zugabe von 10 g  $\text{NaNO}_2$  in die Kulturflaschen. Innerhalb weniger Minuten setzte daraufhin starke Denitrifikation ein (15 - 35 ml Gasausstoß pro min). Die Zellernte wurde während dieser Aktivitätsphase nach 24 h Gesamtinkubation mit einer Ceba Durchlaufzentrifuge vorgenommen. Dieser Anzuchtmodus erbrachte Zellausbeuten von 3 - 4 g Naßgewicht pro Liter Kultursuspension (Zumft und Vega, 1979). Unmittelbar nach der Ernte wurde die Zellpaste im Dreifachen ihres Eigenvolumens 0.05 M Tris/HCl Puffer, pH 7.2 resuspendiert und in der Kälte bei  $8\,000 \cdot g$  15 min lang zentrifugiert. Da Membranpräparationen aus frischen und gefrorenen Zellen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die

Aktivitäten der dissimilatorischen Reduktasen erkennen ließen, wurden die gewaschenen Zellen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  vor ihrer weiteren Verwendung eingefroren.

Zellanzucht zur Untersuchung von Induktions- und Regulationsmechanismen der Denitrifikation

Um vergleichbare Bedingungen für alle verwendeten Organismen zu gewährleisten, wurden diese in dem oben beschriebenen synthetischen Medium kultiviert.

Anaerobe Anzucht unter  $\text{N}_2\text{O}$

In 2 l Enghalsrundkolben wurden 2 l Medium ohne Nitrat angesetzt und davon vor dem Autoklavieren 200 ml für das Inokulum entnommen. Die Vorkultur wurde aus Agar-röhrchen beimpft und für 24 h bei  $30^{\circ}\text{C}$  und 150 rpm im Schüttler inkubiert. Während dieser Zeit konnte nur Luft-sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor genutzt werden. Nach der Inokulation wurde die Hauptkultur während der gesamten Wachstumsperiode von 19 - 21 h bei  $30^{\circ}\text{C}$  unter ständigem Rühren mit  $\text{N}_2\text{O}$  durchspült ( $50 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Wegen der relativ guten Wasserlöslichkeit von  $\text{N}_2\text{O}$  wurde auf die Verwendung von Sinterglasfritten verzichtet. Die Gaszufuhr erfolgte lediglich durch ein offenes Glasrohr. Vor der Zellernte, in der späten logarithmischen Phase, betrug die optische Dichte der Kultur bei 660 nm zwischen 1.6 und 1.8. Dies entsprach einer Ausbeute von 4.0 - 4.5 g Zellen (Naßgewicht) pro Liter Medium.

Anaerobe Anzucht mit Nitrat

Dem Anzuchtmedium wurde  $1 \text{ g NaNO}_3 \cdot \text{l}^{-1}$  entsprechend einer Konzentration von 11.8 mM zugesetzt. Die Inkubationsbedingungen für die 200 ml enthaltende Vorkultur waren die selben wie für anaerobe Kulturen unter  $\text{N}_2\text{O}$ . Der 2 l Rundkolben mit dem Medium für die Hauptkultur wur-

de vor dem Animpfen 15 min mit Argon gespült, um gelösten Sauerstoff auszutreiben. Wegen des niederen Bunsen'schen Absorptionskoeffizienten für Sauerstoff und des sehr geringen Oberflächen/Volumenverhältnisses der Kulturflüssigkeit in dem vollen Enghalsrundkolben wurde die Anzucht selbst ohne Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Nach 12 h Wachstum bei 30 °C gingen die Kulturen bei optischen Dichten (660 nm) zwischen 0.7 und 0.8 in die stationäre Phase über. Die Zellausbeuten betrugen knapp 2 g Naßgewicht pro Liter Medium.

#### Semiaerobe Anzucht ohne Nitrat

Die Anzucht erfolgte in 2 l Erlenmeyerkolben, die nur mit 1 l nitratfreiem Medium beschickt wurden. Davon wurden noch 100 ml für die Vorkulturen entnommen. Sowohl Vor- als auch Hauptkulturen wurden bei 30 °C und 120 rpm für 24 h im Schüttler inkubiert. Die  $OD_{660}$  stieg bis zum Ende der logarithmischen Phase auf 1.6 - 1.8 an. Die Ausbeute lag zwischen 4.0 und 4.5 g Zellnaßgewicht pro Liter Medium.

#### Semiaerobe Anzucht mit Nitrat

Die Bedingungen der Anzucht entsprachen denen für semiaerobe Kulturen ohne Nitrat. Nach 24 h Inkubation erreichte die  $OD_{660}$  Werte zwischen 1.9 und 2.0 entsprechend einer Zellmenge von etwa 5 g pro Liter.

Der  $O_2$  Partialdruck in den Kulturmedien wurde während des Wachstums nicht verfolgt. Mit 120 rpm wurde jedoch die Frequenz des Schüttelinkubators so eingestellt, daß die  $O_2$  Konzentration hinreichend gering war, um die Induktion der  $N_2O$  Reduktase zu gewährleisten und hoch genug, um den Übergang der Kulturen von der logarithmischen in die stationäre Phase nach 22 - 24 h zu bewirken.

## Messung des Wachstums der Zellkulturen

Der Verlauf des Wachstums der Bakterienkulturen wurde indirekt, durch Messung der optischen Dichte der Bakteriensuspensionen bei 660 nm verfolgt. Für Pseudomonas perfectomarinus wurde die optische Dichte in Bezug auf die Zellprotein Konzentration geeicht. Wo nichts anderes vermerkt wurde, erfolgte die Zellernte zu Beginn der stationären Phase.

## 2.2. PRÄPARATIVE METHODEN

### Zellaufschluß

Zu stark konzentrierten Zellsuspensionen wurde pro 5 g Zellnaßgewicht je 1 mg DNase und RNase gegeben. Die Suspensionen wurden dann entweder durch Ultraschall bei 20 kHz und 100 W oder durch dreimalige Passage durch die French-Presse bei 110 MPa aufgeschlossen. Die zuletzt genannte Methode wurde nur angewandt, wenn große Zellmengen für die Präparation von Membranfraktionen behandelt werden mußten. Die Temperatur der Proben wurde während des Aufschlusses unter 10 °C gehalten. Die Reste an intakt gebliebenen Zellen wurden durch Zentrifugation bei 8 000 · g sedimentiert.

### Präparation von Sphäroplasten

Zellsuspensionen wurden mit 2 mg Lysozym pro 5 g Zellnaßgewicht und 0.3 g Saccharose pro ml Suspension versetzt und bei 30 °C für 30 min inkubiert. Während der ersten 5 min wurde langsam gerührt. Das Resultat wurde stets mikroskopisch überprüft. Die sehr empfindlichen Sphäroplasten wurden unmittelbar nach der Präparation für Experimente verwendet.

## Membranpräparation

Die Darstellung von Membranvesikeln erfolgte nach einem von Zumft und Vega (1979) beschriebenen Verfahren. Zellfreie Rohextrakte wurden zur Abtrennung von Zellwandteilen und grösseren Zellbruchstücken 60 min bei 29 000 · g zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen und der Überstand einer weiteren Zentrifugation bei 235 000 · g 120 min lang unterzogen. Das Membranpellet wurde in Tris/HCl Puffer (0.1 M; pH 7.1) resuspendiert. Da zwischen frisch präparierten und gefrorenen Fraktionen keine signifikanten Unterschiede feststellbar waren, konnten die Suspensionen mehrere Wochen bei -20 °C gelagert werden.

## 2.3. ANALYTISCHE METHODEN

### Proteinbestimmung

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry et al. (1951). Zur Proteinbestimmung in ganzen Zellen und Membranfraktionen wurden diese vorher 12 h bei Raumtemperatur mit 1 N NaOH behandelt.

### Nitritbestimmung

Nitrit wurde quantitativ als Azofarbstoff colorimetrisch bei 554 nm gemessen, nachdem die Proben abzentrifugiert und mit Sulfanilamid in HCl und N- (1-Naphtyl)-ethylendiammoniumchlorid versetzt worden waren (Snell und Snell, 1949).

### Analytische, isoelektrische Fokussierung

Membranfraktionen und hochtourige Zentrifugationsüberstände wurden mit Hilfe der von Görg et al. (1979, 1980) beschriebenen Methode der Ultradünnschicht-IEF

untersucht. Dieses Verfahren diente der Aufzeichnung spezifischer Unterschiede im Proteinhmuster von Ps. perfectomarinus Zellen, die bei Verwendung verschiedener Elektrodenakzeptoren angezogen wurden.

#### Absorptions- und Differenzspektren

Die kontinuierlichen photometrischen Spektren im sichtbaren- und im UV Bereich wurden mit einem mikroprozessorgesteuerten Zweistrahl-, Zweiwellenlängengerät, Hitachi, Modell 557 aufgenommen. Bei Experimenten, in denen die Wechselwirkung von Gasen mit biologischen Materialien untersucht wurde, kamen entweder gasdicht verschließbare Küvetten oder 10 ml Serumflaschen zum Einsatz. Die Gasräume wurden evakuiert und mit Helium unter einem Überdruck von 20 mbar gefüllt. Die Elektronenakzeptoren wurden als Lösung oder in Gasform durch die Septumverschlüsse injiziert. Die Konzentrationen der Gaskomponenten im Küvettenraum wurden gaschromatographisch kontrolliert. Auf diese Weise wurden auch Luftkontaminationen erkannt.

#### Quantitative Messung des relativen Oxidationsniveaus von Cytochromen in intakten Zellen

Je 2 ml einer Zellsuspension die etwa 1 mg Protein/ml enthielt wurde mit 150  $\mu$ mol L-Na-Lactat wie oben beschrieben inkubiert. Wenn Serumflaschen als Küvetten verwendet wurden, sind die Mengenangaben zu verdoppeln. Das Absorptionsspektrum der durch Lactat reduzierten Proben wurde in den geräteinternen elektronischen Speicher eingegeben. Die gleichen oder identisch vorbehandelte Zellproben wurden mit unterschiedlichen Elektronenakzeptoren und/oder Hemmstoffen versehen. Um deren Wirkung auf den Oxidationszustand der Zellcytochrome zu erfassen, wurde entweder das kontinuierliche Spektrum zwischen 380 nm und 700 nm oder nur die Absorption der Soretbande bei 420 nm von den entsprechenden gespeicherten Daten der reduzier-

ten Proben subtrahiert. Die Aufzeichnung der zeitlichen Abhängigkeit von Veränderungen der Oxidationsniveaus erfolgte nach dem gleichen Prinzip.

Aktivitätsmessungen der Nitrit-, NO und  $N_2O$ -Reduktasen

Die Bestimmung erfolgte gaschromatographisch und für die NO- und  $N_2O$ -Reduktase durch simultane Erfassung der Substrate und Produkte (siehe unter 2.5.). Die Tests wurden in 12 ml Serumflaschen durchgeführt. Die Komponenten der Reaktionsansätze wurden bei  $0^\circ\text{C}$  zu einem Endvolumen der flüssigen Phase von 3.0 ml vereinigt. An einer Vakuumanlage wurden anschließend die mit Gummisepten verschlossenen Testgefäße mit Helium unter einem Überdruck von 20 mbar gefüllt. Die Reaktionen wurden durch Injektion der gasförmigen (NO,  $N_2O$ ) oder flüssigen (Nitritlösung) Substrate gestartet, nachdem die Testansätze bei der Reaktionstemperatur von  $30^\circ\text{C}$  3 min vorinkubiert wurden. Während der Dauer der Versuche wurden die Ansätze bei  $30^\circ\text{C}$  und einer Schüttelfrequenz von 100 - 120 / min im Wasserbad inkubiert. Für die Messung der Reaktionsgeschwindigkeiten wurden in regelmäßigen Zeitabständen Gasproben von je  $100\ \mu\text{l}$  mit einer gasdichten Spritze entnommen. Die Messung der nicht enzymatischen Nitrit- und NO-Reduktion erfolgte unter den gleichen Bedingungen.

IR Analyse von NO und  $N_2O$

Zusätzlich zur gaschromatographischen Analyse wurden NO und  $N_2O$  noch anhand ihrer charakteristischen Absorptionsbanden im IR Bereich identifiziert. Eine für  $N_2O$  charakteristische Doppelbande liegt bei  $2224\ \text{cm}^{-1}$ ; NO absorbiert bei  $1878\ \text{cm}^{-1}$ . Die Spektren wurden an einem IR Spektralphotometer in Gasküvetten mit 10 m Lichtweg von Dr. H. J. Wunschel, Linde AG, Unterschleissheim, aufgenommen. Im Labor synthetisiertes NO wurde auch mit dieser Methode auf Verunreinigungen durch  $N_2O$  überprüft.

## 2.4. GASE UND CHEMIKALIEN

Nitritreduktase (Cytochrom 551) aus Paracoccus par  
fectomarinus wurde in elektrophoretischer Hinsicht von W. Zunft  
kommerzieller Weise von W. Zunft zur Verfügung gestellt.  
Agar, Trypton und Hefeextrakt wurden von der Fa. Difco  
Laboratories, Detroit bezogen. Ascorbinsäure, Isoascorbin-  
säure und N,N-Dimethylnitrosamin waren von EGA Chemie,  
Steinheim. Von der Fa. Serva, Heidelberg, wurden Ascorbin-  
säure, Tricinpuffer, NADH, FMN, FAD, Rinderserumalbumin,  
Kaliumhexacyanoferrat(III) und Linde Molekularsieb 13X ver-  
wendet. Na-Lactat, Ascorbinsäure, NADH, FMN, FAD, Lysocym,  
RNase, DNase, Methylviologen, Benzylviologen, Phenazin-  
methosulfat und Triton X 100 waren von der Fa. Sigma, Mün-  
chen. Von Alltech Ass., Deerfield, wurden Molekularsieb 13X  
und Aluminiumoxid für gaschromatographische Zwecke bezogen.  
Ebenfalls für die Gaschromatographie wurden Silicagel, Alu-  
miniumoxid und Molekularsieb 13X von WGA, Düsseldorf, sowie  
Porapak Q und R von Waters Ass., Milford, verwendet.  $\text{CuCl}_2$ ,  
ultrapur war von der Fa. Ventron, Karlsruhe, alle übrigen  
Chemikalien von der Fa. E. Merck, Darmstadt.

Helium (99.996%),  $\text{N}_2\text{O}$  (99.5%) und NO (99.8%) waren  
von Linde AG, Hölriegelskreuth. Das kommerziell erhält-  
liche NO wies jedoch mehr als 0.5 Vol.% Verunreinigung durch  
 $\text{N}_2\text{O}$  auf. Zur Verwendung bei der enzymatischen Aktivitäts-  
messung wurde deshalb NO selbst synthetisiert.

Zu einer 1M  $\text{FeSO}_4$  Lösung in 0.1N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , die in einem  
geschlossenen Reaktionsgefäß unter Helium vorgelegt wurde,  
wurde unter starkem Rühren und unter Eiskühlung tropfenweise  
1M  $\text{NaNO}_2$  Lösung zugesetzt. Die ersten, mit Helium verdünnten  
Fraktionen des entstandenen Gases wurden verworfen, der Rest  
unter Wasser in Glasflaschen abgefüllt. Das auf diese Weise  
erzeugte NO hatte einen Reinheitsgrad von mindestens 99.5%  
und enthielt keine gaschromatographisch und IR spektrosko-  
pisch nachweisbare Verunreinigung durch  $\text{N}_2\text{O}$ .

## 2.5. ENTWICKLUNG EINES GASCHROMATOGRAPHISCHEN ANALYSEN- VERFAHRENS ZUR SCHNELLEN UND SIMULTANEN BESTIMMUNG VON $H_2$ , $O_2$ , $N_2$ , $NO$ , $CO$ , $CO_2$ UND $N_2O$

### 2.5.1. SPEZIFISCHE ANFORDERUNGEN

Im Zusammenhang mit der dissimilatorischen Nitritreduktion sind die folgenden Gasarten von Interesse: das reaktionsfähige Radikal  $NO$ , das dem  $CO_2$  isoelektro-nische  $N_2O$ ,  $N_2$  und außerdem  $O_2$ , da die Denitrifikations-prozesse in sehr komplexer Weise vom vorliegenden  $O_2$  Partialdruck beeinflusst werden (Payne, 1973; Knowles, 1982).  $CO$  bindet als Hämiligand an Cytochrome vom o-Typ.  $H_2$  wird verwendet, um Elektronencarriersysteme im reduzierten Zustand zu halten (Zumft und Matsubara, 1982). Eine sekundäre Rolle kommt dem  $CO_2$  zu, das als Endprodukt der Veratmung reduzierter Kohlenstoffverbindungen entsteht.

Zur Verfolgung enzymatischer und regulatorischer Eigenschaften der Nitritrespiration müssen an das Gasanaly-sensystem die folgenden Anforderungen gestellt werden:

- a)  $N_2$ ,  $O_2$ ,  $NO$ ,  $N_2O$ ,  $CO_2$  und  $H_2$  sollten simultan, qualitativ und quantitativ innerhalb eines Konzentrationsbereiches von 300 vpm bis zu 20% für jede der einzelnen Komponenten gemessen werden können.
- b) Eine Serie aufeinanderfolgender Bestimmungen sollte in Intervallen von 3 min möglich sein.
- c) Das Gasprobenvolumen für eine Messung sollte 100  $\mu l$  nicht überschreiten. Wegen der begrenzten Mengen an verfügbaren biologischen Materialien war die Limitierung der Reaktionsräume auf 10 ml erforderlich. Die Probendosierung kann deshalb nicht mittels einer kontinuierlich durchspülten Probenschleife, sondern nur mit Gasspritzen vorgenommen werden.

## 2.5.2. VERFÜGBARE METHODEN

Die IR Absorptionsmethode scheidet aus, weil sie aus Gründen der Molekülstruktur nur für  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_2$  und NO anwendbar ist. In begrenztem Umfang können selektive Elektroden eingesetzt werden, wie z. B. die Clark Elektrode zur Messung von  $\text{O}_2$  in der Gasphase und in etwas veränderter Form auch für  $\text{N}_2\text{O}$  (Alefounder und Ferguson, 1982). In den letzten Jahren wurde wiederholt versucht, mit Hilfe der Massenspektrometrie bisher ungeklärte Fragen im Zusammenhang mit der Reaktionssequenz der Denitrifikation zu klären (St. John und Hollocher, 1977; Firestone et al., 1979; Garber und Hollocher, 1981). Als Routinemethode ist dieses Verfahren wegen der notwendigen Vortrennung der Gase und wegen des hohen apparativen Aufwandes nicht geeignet. Mit einer empfindlichen Chemolumineszenztechnik lassen sich sehr geringe Konzentrationen von NO quantitativ messen. Bis vor etwa 15 Jahren bediente man sich der Warburg Manometrie als Standardverfahren, das sich vor allem bei zahlreichen Untersuchungen über Photosynthese- und Atmungsprozesse zur Messung von  $\text{O}_2$  und  $\text{CO}_2$  als sehr leistungsfähig gezeigt hatte. Bei Arbeiten über die bakterielle Denitrifikation erwies sich die fehlende qualitative Aussagekraft dieser Methode als Nachteil.

Seit der Entwicklung poröser, aromatischer Polymere zur Verwendung als stationäre Phase für die Gaschromatographie durch Hollis (1966) wurde dieses Material häufig für Gastrennungen im Rahmen von Untersuchungen über die Nitritrespiration eingesetzt (Barbaree und Payne, 1967; Wharton und Weintraub, 1980; Zumft und Vega, 1979). Trotz erheblicher Verbesserungen, die die Gaschromatographie für die qualitative Analyse brachte, mussten auch weiterhin Einschränkungen in Kauf genommen werden. Die simultane Analyse der interessierenden Komponenten innerhalb des geforderten Zeitraumes war nicht möglich. Zu-

sätzlich verursachte Wasserdampf, der in Gasproben von Headspace Analysen stets enthalten ist, verbreiterte Nachzügler Peaks auf allen verfügbaren Porapak Phasen (Thompson, 1977).

Anorganische Adsorbenzien bringen die gleichen Nachteile mit sich, wenn simultane und schnelle Analysen benötigt werden (Thompson, 1977). Ebenso wie poröse Polymere trennen Silicagel (Szulcowski und Higuchi, 1957) und Aluminiumoxid  $O_2$ ,  $N_2$  und  $NO$  nur bei Temperaturen unter  $-70^\circ C$ . Zur Elution von  $N_2O$  und  $CO_2$  wäre unter diesen Bedingungen sogar ein Temperaturprogramm nötig (Jeffrey und Kipping, 1972). Aluminiumoxid adsorbiert  $CO_2$  auch bei höheren Temperaturen praktisch irreversibel. Na- und Ca-Alumosilikate, die unter der Handelsbezeichnung "Molekularsieve" erhältlich sind, sind die einzigen Materialien, die bei Raumtemperatur eine zufriedenstellende Auftrennung zwischen  $O_2$ ,  $N_2$  und  $NO$  ermöglichen (Jeffrey und Kipping, 1972). Auch hier sind zur Elution der Gruppe der schweren Gase genauso wie im Fall der übrigen Adsorbenzien zeitaufwendige Temperaturprogramme notwendig (Thompson, 1977).

Ein isotherm betriebenes Mehrsäulensystem könnte die spezifischen Vorteile verschiedener Adsorbenzien nutzen und gleichzeitig deren individuelle Nachteile umgehen.

Wilhite und Hollis (1968) schalteten zwei unterschiedliche Porapaktypen in Serie. Damit gelang ihnen die Bestimmung von 16 Gasen in weniger als zehn Minuten, aber  $H_2O$  wurde erst nach elf Minuten und  $N_2O$  nach über fünf Minuten eluiert. Diese Anordnung wurde in einer Raumsonde zur Analyse der Marsatmosphäre verwendet. Mit Hilfe eines Dreisäulen-Zweidetektorsystems gelang Trowell (1965) die Analyse von  $H_2$ ,  $N_2$ ,  $O_2$ ,  $NO$ ,  $N_2O$ ,  $NO_2$ ,  $CO$  und  $CO_2$  inner-

halb von zehn Minuten. Die integrierte Molekularsiebsäule konnte in dieser Anordnung nur für einen Monat benutzt werden, da sie nicht vor desaktivierenden Substanzen, wie z. B. Wasser, geschützt war.

Andere, unterschiedliche Mehrsäulensysteme zur Messung ähnlicher oder identische Gasgemische wurden von Smith und Dowdell (1973), Hecker und Bell (1981), Landau und Petersen (1974), Tunstall (1970), Thompson (1977), Renner und Becker (1970), Hall und Dowdell (1981) und anderen beschrieben. Die erforderlichen Analysenzeiten sind jedoch für kinetische Untersuchungen zu lang, Simultananalysen nicht immer möglich (Hecker und Bell, 1981) und Nachzüglerpeaks würden zu Signalinterferenzen zwischen aufeinanderfolgenden Messungen führen.

Im folgenden wird der Aufbau und die Leistung eines automatisierten, computergesteuerten Mehrsäulensystems dargestellt, das  $H_2$ ,  $O_2$ ,  $N_2$ ,  $NO$ ,  $CO$ ,  $N_2O$  und  $CO_2$  in 140 s trennt und analysiert oder in 110 s, wenn  $CO_2$  nicht mitgemessen werden muß. Es wurde ein isotherm arbeitender Gaschromatograph der unteren Preisklasse mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD) eingesetzt.

### 2.5.3. AUFBAU DES TRENNSYSTEMES

#### 2.5.3.1. AUSWAHL UND AKTIVIERUNG DER STATIONÄREN PHASEN

Die leichten Gase  $H_2$ ,  $O_2$ ,  $N_2$ ,  $NO$  und  $CO$  wurden von der Gruppe der schweren Gase mit einer Aluminiumoxid-säule (2.0 m x 3 mm ID; 45 - 60 mesh), die 1 h lang im Heliumstrom bei 120 °C aktiviert wurde, abgetrennt. Die bei der Arbeitstemperatur von 40 °C praktisch irreversible Adsorption von  $H_2O$  wurde gezielt genutzt, um die angeschlossenen Molekularsiebsäulen vor Desaktivierung durch  $H_2O$  zu schützen. Für die Messung von  $CO_2$  zusammen mit den übrigen Gas-

arten wurde die Aluminiumoxidsäule gegen eine in Serie geschaltete Kombination aus einer 0.2 m langen Silicagelsäule (45 - 60 mesh; ID = 3 mm) und einer 2.50 m langen Porapak Q Säule (60 - 80 mesh; ID = 3 mm) ausgetauscht. Der Silicagelsäule kam hierbei lediglich die Funktion eines Wasseradsorbers zu. Porapak Q trennt ebenso wie Aluminiumoxid die Gruppe der leichteren Gase von der der schweren ab, jedoch mit dem Unterschied, daß hier  $\text{CO}_2$  nicht überdurchschnittlich stark adsorbiert wird, sondern von  $\text{N}_2\text{O}$  getrennt kurz vor diesem eluiert wird.

In Intervallen von 3 Monaten wurden die Aluminiumoxid- und Silicagelsäule neu konditioniert. Dies geschah relativ einfach durch 30 minütiges Ausheizen bei  $120^\circ\text{C}$  unter normalem Carriergasstrom im Gerät. Kurz nach Wiedererreichen der Arbeitstemperatur wurde auf die Aluminiumoxidsäule zwischen 30 und 40  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  aufgetragen, bis die absolute Retentionszeit für  $\text{N}_2\text{O}$  auf den Sollwert von 1.60 min gesunken war (kontrollierte Desaktivierung).

Baselinentrennungen zwischen  $\text{N}_2$ ,  $\text{O}_2$  und NO gelingen bei Raumtemperatur oder darüber nur mit Molekularsieben (Jeffrey und Kipping, 1972). Wegen seiner spezifischen Retentionscharakteristik wurde MS 13X, ein Na-Alumosilikat mit einem mittleren Porendurchmesser von 1 nm verwendet. Materialien verschiedener Hersteller wiesen alle nicht die erforderlichen Eigenschaften auf. Es bestand die Notwendigkeit, mittels geeigneter Aktivierungsprozesse hinreichende Trennleistung zu erzielen ohne dabei gleichzeitig ein "tailing" der NO Peaks (eine unerwünschte Eigenschaft aller Molekularsiebe) in Kauf nehmen zu müssen.

Die MS 13X Partikel (45 - 60 mesh) wurden zehnmal mit deionisiertem Wasser gewaschen, um anhaftende Staubteilchen zu entfernen (Farre-Rius und Guiochon, 1963). Hierbei wurden etwa 10 % des ursprünglichen Trockengewichtes verloren. Anschließend wurde das Material bei  $120^\circ\text{C}$

bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach diesem Schritt war die Trennleistung noch völlig unbefriedigend (Abb. 3A).

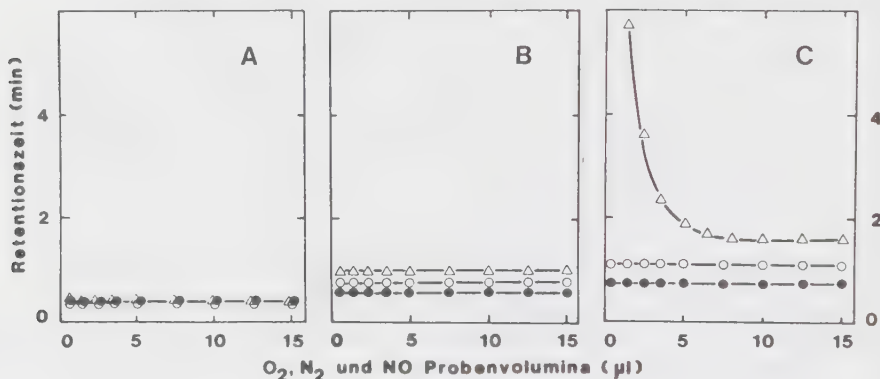


Abb. 3 Retention von NO und Trennung von O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> und NO durch unterschiedlich aktiviertes Molekularsieb 13X

Eine Molekularsieb 13X Säule (2.50 m · 3 mm ID) wurde in drei unterschiedliche Aktivitätsstufen überführt. Die Retentionszeit für NO als Funktion der aufgetragenen NO Menge und die Trennleistungen für Gasgemische aus O<sub>2</sub> (●), N<sub>2</sub> (○) und NO (△) wurden für jede der Stufen bestimmt.

- 3A: Staubfrei gewaschenes MS 13X (45 - 60 mesh) wurde 5 h bei 120 °C im Luftstrom getrocknet. Es erfolgt keine Trennung.
- 3B: Das Material wurde im Luftstrom für 10 h auf 200 °C erhitzt. Die Trennleistung entspricht den Erfordernissen und die Retentionszeit für NO ist unabhängig von der applizierten Menge.
- 3C: Die Säule wurde im Gerät 8 h unter Heliumstrom auf 300 °C erhitzt. Dadurch konnte die Trennleistung nochmals gesteigert werden. Die Retentionszeit für NO war jetzt aber abhängig von der aufgetragenen NO Menge.

Betriebsbedingungen: Helium Flußrate 100 ml/min;  
Säulentemperatur 40 °C

Zur weiteren Aktivierung wurden drei Wege miteinander verglichen. Die von Trowell (1965) vorgeschlagene kurzzeitige Erhitzung auf  $200^{\circ}\text{C}$  unter Helium brachte keine nennenswerte Verbesserung. Die Verlängerung dieser Behandlung verursachte NO-tailing ohne signifikante Steigerung der Trennleistung. Eine erfolgreiche, aber aufwendige Methode wurde von Dietz (1968) beschrieben. Vergleichbare Resultate konnten wir durch Verwendung von staubfrei gewaschenem Material erzielen, das wie oben dargestellt weiter behandelt worden war (Abb. 3B). Innerhalb des erfaßbaren Konzentrationsbereiches blieben die Retentionszeiten für NO konstant.

#### 2.5.3.2. FUNKTION DES DREISÄULENSYSTEMES

Die Trennsäulen  $S_1$  und  $S_2$  wurden in einem Shimadzu GC 3BT installiert. Die Restriktorsäule  $S_3$  und das Vierwegeventil wurden extern angebracht (Abb. 4). Über Injektor 1 werden die Gasproben auf die Aluminiumoxidsäule  $S_1$  aufgetragen. Wasserdampf und  $\text{CO}_2$  werden hier unter Arbeitsbedingungen sehr fest adsorbiert. Die Gruppe der leichten Gase wird als zusammengesetzter Peak eluiert und nach Passieren des Detektors über das Ventil auf die Molekularsiebsäule geleitet. Jetzt erfolgt die zeitgesteuerte Umschaltung, wobei  $S_1$  und  $S_2$  von Serienschaltung über den Detektor (SAD) in Parallelstellung gebracht werden. Die leichten Gase werden auf  $S_2$  getrennt und im Referenzkanal der Meßbrücke detektiert, bevor  $\text{N}_2\text{O}$  (und  $\text{CO}_2$ ) die Aluminiumoxidsäule verläßt und im Probenkanal des Detektors analysiert wird (Abb. 4). Die Gaschromatogramme setzen sich deshalb aus positiven und negativen Peaks zusammen. Nach Beendigung einer Analyse wird das Vierwegeventil wieder in die Startposition (SAD) zurückgeschaltet. Die Gesamtdauer beträgt 110 s. Signalüberlagerungen treten nicht auf.

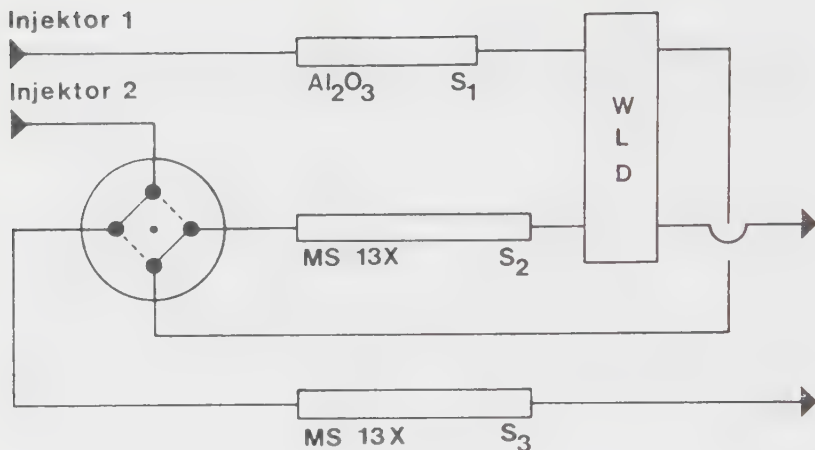


Abb. 4 Gasflußdiagramm des Dreisäulensystems

Die SAD Anordnung der Trennsäulen  $S_1$  und  $S_2$  wird durch die ausgezogenen Linien im Ventil dargestellt, die Parallelstellung durch die unterbrochenen Linien. Um rasche Restabilisierung der Basislinie nach den Umschaltungen zu erreichen, muß der Rückdruck der Restriktorsäule  $S_3$  identisch sein mit dem der Trennsäule  $S_2$ . Für die Probenapplikation wird Injektor 1 benutzt. Sollen nur Komponenten aus der Gruppe der leichten Gase bestimmt werden, erfolgt die Einspritzung über Injektor 2, wobei  $S_1$  und  $S_2$  in Parallelstellung geschaltet sind.

Betriebsbedingungen: Trägergasfluß: 210 ml Helium pro min durch Kanal 1 ( $S_1 + S_2$  oder  $S_3$ ); 195 ml Helium durch Kanal 2 ( $S_2$  oder  $S_3$ ); Temperatur: 40 °C. Zur Datenberechnung und zur automatischen, zeitabhängigen Ventilumschaltung wird ein Spectra Physics SP 4100 Integrator benutzt.

### 2.5.3.3. DETEKTION

Wärmeleitfähigkeitsdetektoren besitzen aus physikalisch bedingten Grenzen eine im Vergleich zu allen Typen von Ionisationsdetektoren geringe Empfindlichkeit (Kaiser, 1973). Zur Analyse anorganischer Gasgemische innerhalb eines weiten Konzentrationsbereiches sind sie jedoch noch immer die einzigen geeigneten Instrumente. Die unter den im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Bedingungen erreichten Erfassungsgrenzen und Standardabweichungen wurden in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1 Erfassungsgrenzen und relative Standardabweichungen

| Gasart              | Erfassungsgrenze<br>(vpm) | RSD<br>(%) |
|---------------------|---------------------------|------------|
| Wasserstoff         | 1 000                     | 3.5        |
| Sauerstoff          | 100                       | 0.8        |
| Stickstoff          | 100                       | 0.6        |
| Stickstoffmonoxid   | 200                       | 0.9        |
| Kohlenstoffmonoxid  | 150                       | —          |
| Kohlenstoffdioxid   | 200                       | 0.7        |
| Distickstoffmonoxid | 200                       | 0.8        |

Die relativen Standardabweichungen sind vergleichbar mit denen von anderen Autoren (Landau und Petersen, 1974; Dietz, 1968). Bedingt durch das geringe Probenvolumen von maximal 100  $\mu$ l liegen die hier gezeigten Erfassungsgrenzen höher als in vergleichbaren Mehrsäulensystemen (Dietz, 1968; Hecker und Bell, 1981).

Die Oberflächenkorrosion der Rhenium-Wolfram Filamente der Wärmeleitfähigkeitszelle wurde zum Problem, da die meisten Gasproben das reaktive NO enthielten. Nach einigen Monaten konnte die Wheatstone-Brücke mit den eingebauten Abgleichpotentiometern nicht mehr ausbalanciert werden. Als Folge von Oberflächenkorrosion war der elektrische Widerstand der Heizdrähte (unsymmetrisch) über die noch zulässigen Werte angestiegen. Durch Parallelschaltung von Trimpmpotentiometern, die mit fortschreitender Korrosion nachjustiert wurden, konnte die Verwendungsdauer des Detektors mindestens verdoppelt werden. Die hierdurch verursachten, geringen Einbußen an Nachweisempfindlichkeit machten sich nicht nachteilig bemerkbar. (Abb. 5).

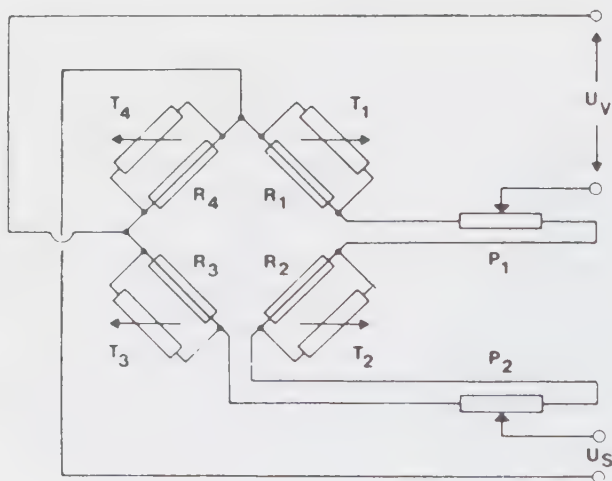


Abb. 5 Schaltbild der Wheatstone-Brücke des Detektors

$R_1 - R_4$  Rhenium-Wolfram Filamente, Sollwiderstand 100 Ohm;  $T_1 - T_4$  zugeschaltete Trimpmpotentiometer 0.5 - 5 kOhm;  $P_1$  und  $P_2$  vorhandene Abgleichpotentiometer 0.05 Ohm bzw. 5 Ohm;  $U(V)$  Versorgungsspannung 9 - 24 V;  $U(S)$  Signalspannung.

### 2.5.3. EICHUNG UND GASANALYSE

Die Aktivitätstests wurden in gasdicht verschlossenen Serumfläschchen von 12 ml Gesamtvolumen und 3-ml Flüssigphase durchgeführt. An einer Vakuumanlage wurden die Gefäße mit Helium bei leichtem Überdruck von 20 mbar gefüllt. Zur Äquilibrierung und während der Reaktionsdauer wurden die Proben im Wasserbad bei 30 °C und einer Schüttelfrequenz von 100 · min<sup>-1</sup> inkubiert. Nach jeweils 3 min Temperaturangleichung erfolgte der Start der Reaktionen durch Injektion der Elektronenakzeptoren Nitrit, NO oder N<sub>2</sub>O. Die Proben wurden aus der Gasphase der Testansätze durch die Gummisepten entnommen. Durch den Innenüberdruck der Serumgläser wurde die Kontamination der Proben mit Luft während des Transfers in der Gasspritze verhindert. Luftverunreinigung würde die Bestimmung von O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> und NO stören. Der vom erhöhten Innendruck verursachte Gasprobenausstrom aus der Probennahmespritze wurde durch entsprechende Eichung mit externen Standardansätzen und zur Kontrolle durch Berechnung erfasst. Mit Ausnahme der biologischen Materialien waren die Eichansätze mit den Testansätzen identisch. Die absolute Genauigkeit dieser Methode erwies sich für O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, NO und N<sub>2</sub>O besser als 2.7 %. Zur Kontrolle wurden die durch Druckdifferenz verursachten Abweichungen wie folgt berechnet:

$$m_{\text{akt}} = m_{\text{det}} \cdot p_i \cdot p_a^{-1} \quad (I)$$

$m_{\text{akt}}$  = tatsächliche Menge einer Gaskomponente im Testansatz (μmol)

$m_{\text{det}}$  = gemessene Menge der Gaskomponente (μmol)

$p_i$  = Gesamtgasdruck im Testansatz (mbar)

$p_a$  = aktueller Luftdruck (mbar)

$$p_i = p_s + V_{\text{add}} \cdot p_a \cdot V_g \quad (\text{II})$$

$p_s$  = Gasdruck im Testansatz vor der Zugabe gasförmiger Reaktionsteilnehmer (mbar)

$V_{\text{add}}$  = zugegebenes Gasvolumen der Reaktionsteilnehmer mit dem Druck  $p_a$  (ml)

$V_g$  = Volumen des Gasraumes der Testgefäße (ml), hier: 9 ml

Gleichung II in Gleichung I eingesetzt ergibt die zur Korrektur benötigte Gleichung III:

$$m_{\text{akt}} = m_{\text{det}} \cdot (p_s \cdot p_a^{-1} + V_{\text{add}} \cdot V_h^{-1}) \quad (\text{III})$$

Gleichung II berücksichtigt nicht die Äquilibrierung der Gaskomponenten zwischen flüssiger Phase und Gasphase. Die Kontrollrechnung hat deshalb nur Gültigkeit für Gase mit geringer Wasserlöslichkeit. Hierzu zählen  $O_2$ ,  $N_2$  und  $NO$ , nicht jedoch  $N_2O$  und  $CO_2$ . Zusätzlich ist zu berücksichtigen, daß Konzentrations- und Adsorptionseffekte gelöster und suspendierter Stoffe das Verteilungsgleichgewicht von Gasen zwischen flüssiger und fester Phase beeinflussen können. Aus diesem Grund wurde die Berechnung der Gasmengendifferenz als Näherungsmethode zur unabhängigen Kontrolle und Ergänzung der Eichung mit externen Standards eingesetzt.

Die Leistungsfähigkeit des Dreisäulensystems, dessen Konzeptionierung und Aufbau beschrieben wurde, sei am Beispiel der folgenden Gaschromatogramme dargestellt (Abb. 6 und 7).

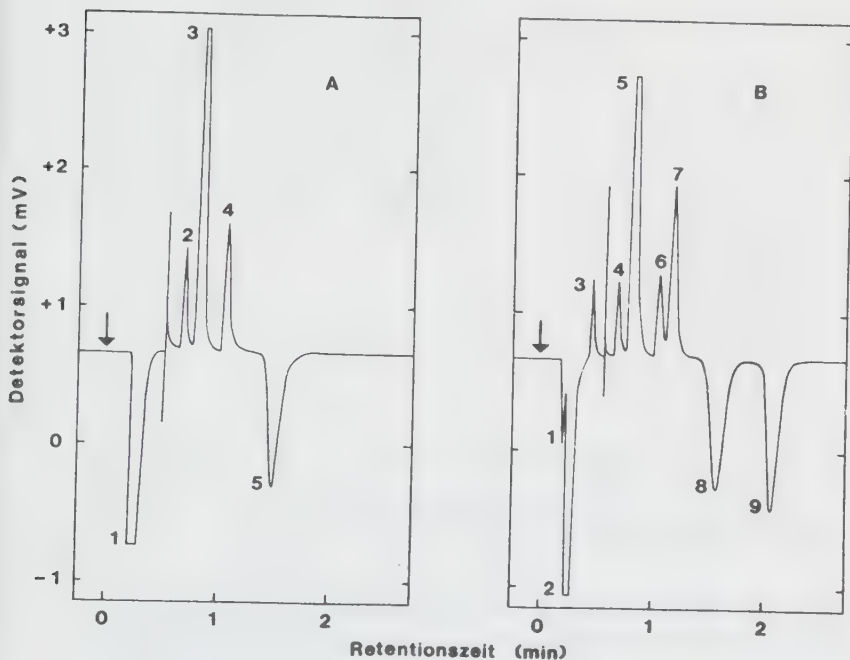


Abb. 6 Chromatographische Trennung von Gasen, die im Zusammenhang mit der bakteriellen Denitrifikation von Interesse sind

Betriebsparameter: Trägergas: Helium 210 ml/min durch Kanal 1 und 193 ml/min durch Kanal 2. Temperatur, 40 °C.

Abb. 6A: Säule S1, Aluminiumoxid (2.0 m x 3 mm ID).  
Elution: 1,  $N_2 + O_2 + NO$ ; 2,  $O_2$ ; 3,  $N_2$ ;  
4,  $NO$ ; 5,  $N_2O$ .

Abb. 6B: Säule S1, Porapak Q (2.50 m x 3 mm ID) in Serie mit Silicagel (0.2 m x 3 mm ID)  
Elution: 1,  $H_2$ ; 2,  $N_2 + O_2 + NO + CO$ ; 3,  $H_2$ ;  
4,  $O_2$ ; 5,  $N_2$ ; 6,  $NO$ ; 7,  $CO$ ; 8,  $CO_2$ ;  
9,  $N_2O$ .

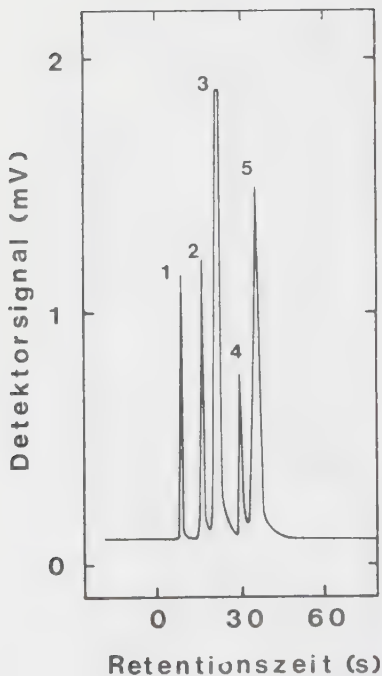


Abb. 7

Schnelltrennung der Gruppe der leichten Gase

Die Probenapplikation erfolgte über Injektor 2 bei Parallelstellung der Aluminiumoxid- und der Molekularsiebsäule 13X. Trägergas: Helium, 290 ml/min; Temperatur: 40 °C; Elution: 1, H<sub>2</sub>; 2, O<sub>2</sub>; 3, N<sub>2</sub>; 4, NO; 5, CO.

Wegen der Reaktion des NO mit O<sub>2</sub> zu NO<sub>2</sub>, konnten die Wechselwirkungen beider Gase mit Denitrifikationsprozessen in der Regel nicht in Gegenwart der jeweils anderen Komponente untersucht werden. Unabhängig davon wurde die Möglichkeit, bei allen Aktivitätstests O<sub>2</sub> mit zu bestimmen genutzt, um Luftkontamination in den Reaktionsräumen zu erkennen.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. EXPRESSION DER DENITRIFIKATIONSENZYME

##### 3.1.1. TERMINALE ELEKTRONENAKZEPTOREN ALS INDUKTIONS- UND REPRESSIONSFAKTOREN

Um innerhalb kurzer Zeit hohe Ausbeuten an denitrifizierenden Zellen zu erhalten, wurde für Pseudomonas perfectomarinus ein Anzuchtmodus gewählt, der alternierende semiaerobe und anaerobe Phasen beinhaltet (Zumft und Vega, 1979; Zumft und Frunzke, 1982). Maximale Wachstumsraten wurden während der semiaeroben Perioden erzielt. Zur Induktion der Denitrifikationsenzyme dienten die anaeroben Abschnitte. Die Nitritkonzentration, die optische Dichte der Kulturen und die spezifischen NO- und N<sub>2</sub>O-Reduktaseaktivitäten wurden über den gesamten Wachstumsverlauf von 24 h verfolgt (Abb. 8).

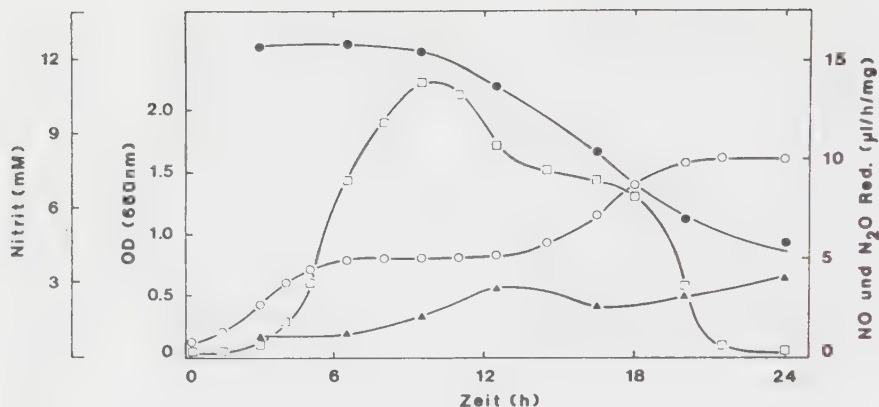


Abb. 8 Veränderung der spezifischen NO- und N<sub>2</sub>O-Reduktaseaktivität in einer Kultur von *Ps. perfectomarinus*, die alternierend unter semiaeroben und anaeroben Bedingungen gehalten wurde.

19 l nitrathaltiges Komplexmedium wurden mit einer semiaerob angezogenen Vorkultur von 1 l beimpft. Die Kultur wurde beginnend mit einer semiaeroben Phase alternierend im 6 h Rhythmus durch eine Sinterglasfritte belüftet (500 ml/min) und anaerob inkubiert. In Abständen von 3–4 h wurden Zellproben für die Aktivitätsmessungen entnommen. Die Nitritkonzentration und die optische Dichte wurden nach jeweils 1–1.5 h bestimmt.  
Symbole: ○—○, OD (660 nm); □—□, Nitritkonzentration; ▲—▲, spezifische NO-Reduktaseaktivität; ●—●, spezifische N<sub>2</sub>O-Reduktaseaktivität.

Maximale spezifische N<sub>2</sub>O-Reduktaseaktivität wurde in den Kulturphasen ermittelt, in denen Nitrat, Nitrit und Sauerstoff als terminale Elektronenakzeptoren zur Verfügung standen. Im fortgeschrittenen Stadium, ab etwa 12 h wenn bereits N<sub>2</sub>O als Intermediärprodukt der Nitritatmung gaschromatographisch nachgewiesen werden konnte, ging die Aktivität zurück und erreichte nach 24 h nur noch knapp die Hälfte des ursprünglichen Niveaus. Die spezifische

NO-Reduktaseaktivität stieg über die Gesamtzeit betrachtet um fast das Dreifache. Der Anstieg findet in den anaeroben Abschnitten statt, während in der zweiten Begasungsphase ein vorübergehendes Absinken zu erkennen ist.

In einem weiteren Experiment wurden Kulturen von Pseudomonas perfectomarinus in Komplexmedium von Beginn an verschiedene Elektronenakzeptoren zur Verfügung gestellt, um deren Wirkung auf die Synthese der  $N_2O$ -Reduktase zu testen (Tab. 2). Während der Versuchsdauer erfolgte keine Veränderung der Sauerstoffzufuhr wie im vorher beschriebenen Experiment.

Tabelle 2

Wirkung verschiedener Elektronenakzeptoren auf die Synthese der  $N_2O$ -Reduktase von Pseudomonas perfectomarinus

| Anzuchtbedingungen |            | Spezifische $N_2O$ -Reduktase-<br>aktivität<br>(nkat · (mg Protein) <sup>-1</sup> ) |
|--------------------|------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Anaerob            | + $N_2O$   | 2.4 ± 0.7                                                                           |
| Anaerob            | + $NO_3^-$ | 4.7 ± 0.5                                                                           |
| Semiaerob          | + $NO_3^-$ | 4.0 ± 1.1                                                                           |
| Semiaerob          |            | 3.4 ± 0.7                                                                           |

Die niedrigste Aktivität wurde in Zellen, die unter  $N_2O$  Begasung angezogen wurden, festgestellt. Niedrige Sauerstoffpartialdrucke reprimieren die Enzymsynthese nicht. Auch wenn Sauerstoff allein als Akzeptor zur Verfügung stand, lagen die Aktivitäten höher als die an  $N_2O$ -Kulturen gemessenen.

Im folgenden Abschnitt werden die Wirkungen verschiedener terminaler Elektronenakzeptoren auf die Induktion der Nitritreduktase, der NO-Reduktase und der  $N_2O$ -Reduktase verglichen. Die hierzu notwendigen Zellanzuchten wurden in synthetischem Asparagin/Citrat-Medium vorgenommen (Tab. 3).

Tabelle 3

Induktion der Denitrifikationsenzyme als Funktion verschiedener terminaler Elektronenakzeptoren im Anzuchtmedium

| Anzuchtbedingungen |                                                 | Spezifische Aktivität (nkat · mg <sup>-1</sup> )* |         |                       |
|--------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------|---------|-----------------------|
|                    |                                                 | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> Red.                 | NO Red. | N <sub>2</sub> O Red. |
| Anaerob            | +NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>                   | 3.06                                              | 1.08    | 5.31                  |
| Anaerob            | +NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Cu <sup>2+</sup> | 3.89                                              | 2.04    | 0.92                  |
| Anaerob            | +N <sub>2</sub> O                               | 0.04                                              | 0.60    | 2.84                  |
| Anaerob            | +N <sub>2</sub> O -Cu <sup>2+</sup>             | kein Wachstum                                     |         |                       |
| Semiaerob          | +NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>                   | 0.74                                              | 0.75    | 3.91                  |
| Semiaerob          |                                                 | 0.11                                              | 0.40    | 3.35                  |
| Aerob **           | +NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>                   | 0.0                                               | 0.0     | 0.3                   |
| Aerob **           |                                                 | 0.0                                               | 0.0     | 0.1                   |

Cu-freies Medium wurde als zusätzlicher Faktor zur Steuerung der Aktivitätsverteilung eingesetzt, da Cu ein funktioneller Bestandteil der  $N_2O$ -Reduktase von Pseudomonas perfectomarinus ist (Matsubara et al., 1982).

\* Die Werte sind auf die Aufnahme des Elektronenakzeptors bezogen. Die Messungen erfolgten während der späten logarithmischen Wachstumsphase.

\*\* Aerobe Bedingungen wurden durch Schütteln von 500 ml Medium in 2 l Enghalserlenmeyerkolben bei 200 · min<sup>-1</sup> erzielt.

Semiaerob und anaerob kultivierte Zellen wiesen vergleichbare spezifische  $N_2O$ -Reduktaseaktivität auf.  $N_2O$  selbst stimuliert die Synthese seiner Reduktase nicht. Im Gegenteil, unter anaeroben Bedingungen ohne  $N_2O$  konnte höhere  $N_2O$ -Reduktase-Induktion festgestellt werden. Bei reduziertem Partialdruck (semiaerob) reprimierte Luftsauerstoff die Synthese der  $N_2O$ -Reduktase nicht. Nitrat, bzw. dessen Reduktionsprodukte ließen keine induktive Wirkung erkennen. Nur unter Sättigung der Anzuchtmedien mit Luft (aerob) unterblieb die Synthese der  $N_2O$ -Reduktase ebenso wie die der Nitrit- und NO-Reduktasen.

Höchste spezifische Aktivitäten von Nitrit- und NO-Reduktasen wurden an Zellen aus anaeroben Anzuchten in nitrathaltigem Medium gemessen. Die Synthese beider Enzyme wird durch Nitrat induziert und im Gegensatz zur  $N_2O$ -Reduktase schon beim Vorliegen reduzierter Sauerstoffpartialdrucke reprimiert. Die Repression der NO-Reduktase ist stärker ausgeprägt als die der Nitritreduktase, denn Zellen aus semiaeroben Nitratkulturen besitzen in der log. Wachstumsphase stets höhere Nitritreduktaseaktivität. Nach dem Erreichen der stationären Phase hatten sich beide Aktivitätsraten stets einander angenähert (Tab. 3).

### 3.1.2. BIPHASISCHES WACHSTUM ALS FOLGE VON INDUKTIONS- UND REPRESSIONSMECHANISMEN

Die Wachstumskurven von anaeroben, nitrathaltigen Kulturen von Pseudomonas perfectomarinus zeigen unter bestimmten Bedingungen biphasischen Verlauf (Abb. 9). Während einer ersten log. Wachstumsphase wird Nitrat zu Nitrit reduziert und dieses quantitativ in der Kultur akkumuliert. Nach einer intermediären lag Phase, deren Dauer von der aktuellen Zelldichte abhängt, setzt die Nitrit-

aufnahme und mit zeitlicher Verzögerung die zweite Wachstumsperiode ein. Der Übergang von der zweiten exp. Phase in die stationäre Phase war von einem raschen Absinken der  $N_2$  Produktion durch die Zellkulturen begleitet.

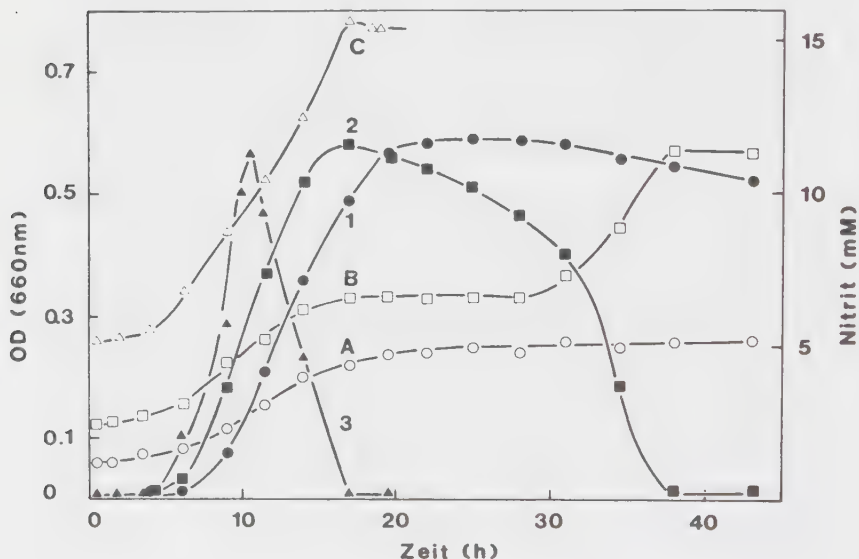


Abb. 9 Biphasisches Wachstum (Diauxie) von *Pseudomonas perfectomarinus* unter anaeroben Bedingungen in Nitrat-haltigem Medium

Drei Kulturansätze (2 l Standkolben) wurden mit 100 ml (Kultur A), 200 ml (Kultur B) bzw. 400 ml (Kultur C) derselben Vorkultur (anaerob + Nitrat) beimpft. Alle übrigen Bedingungen waren für die drei Ansätze identisch.

Kultur A mit der Start OD von 0.06 (5 % Inokulum):  
A, OD (660 nm) ○—○; 1, Nitritkonzentration ●—●.  
Kultur B mit der Start OD von 0.12 (10 % Inokulum):  
B, OD (660 nm) □—□; 2, Nitritkonzentration ■—■.  
Kultur C mit der Start OD von 0.25 (20 % Inokulum):  
C, OD (660 nm) △—△; 3, Nitritkonzentration ▲—▲.

Die spezifische Nitritreduktaseaktivität von Zellen, die aus der dichtesten und aus der mittleren Kultur zum Zeitpunkt maximaler Nitritkonzentration entnommen wurden, lag um den Faktor 2.1 bzw. 4.3 niedriger als die entsprechenden Vergleichswerte, die beim Erreichen der stationären Phase gemessen wurden. Die Kultur mit der geringsten Startdichte von 0.6 ging auch nach 40 h nicht in eine zweite exp. Wachstumsphase über. Dies steht im Einklang mit früheren Beobachtungen an Kulturen von Pseudomonas perfectomarinus, die nicht denitrifizierten, wenn nicht durch Einschaltung einer aeroben Wachstumsphase die Zelldichte erhöht worden war (Zumft und Vega, 1979).

### 3.2. HEMMUNG DER $N_2O$ -REDUKTASE DURCH NO UND $O_2$

Die bereits eingangs erwähnten, indirekten Hinweise auf die Hemmung der  $N_2O$ -Reduktaseaktivität durch NO konnten an Pseudomonas perfectomarinus verifiziert werden. In Zellen, die anaerob mit  $N_2O$  angezogen wurden ( $N_2O$  Zellen), bewirkte die Injektion von 500  $\mu$ l NO (entspricht einer Konzentration von 100  $\mu$ M in Lösung) zum Testansatz vollständige Hemmung der  $N_2O$ -Reduktaseaktivität (Abb. 10). Im Kontrollansatz ohne NO wurde  $N_2O$  quantitativ zu  $N_2$  reduziert (Matsubara et al., 1982).

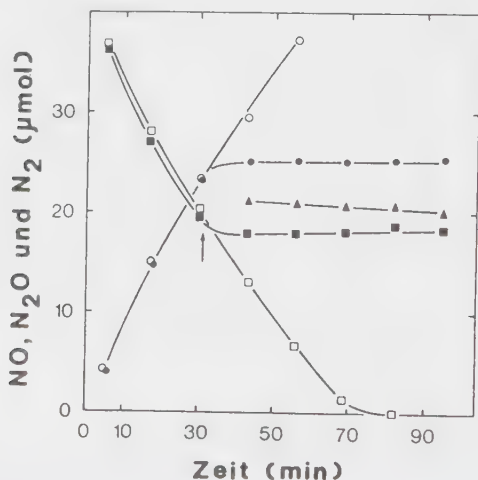


Abb. 10 Hemmung der  $N_2O$  Reduktion durch NO in Zellen von Pseudomonas perfectomarinus

Die Zellen wurden unter anaeroben Bedingungen mit  $N_2O$  als Elektronenakzeptor angezogen. Der Testansatz enthielt Zellsuspension mit insgesamt 4 mg Protein. Der Verlauf der  $N_2O$  Reduktion (■) und der  $N_2$  Produktion (●) wurden gaschromatographisch verfolgt. Nach 31 min wurden 21  $\mu$ mol NO (▲) injiziert (Pfeil) und dessen Konzentrationsänderung in der Gasphase ebenfalls aufgezeichnet. Im Kontrollansatz, dem kein NO zugegeben wurde, blieben  $N_2O$  Reduktion (□) und  $N_2$  Produktion (○) unbeeinträchtigt.

### 3.2.1. SENSITIVITÄTSUNTERSCHIEDE GEGENÜBER NO

Zellen, die mit unterschiedlichen Elektronenakzeptoren angezogen wurden, zeigten ungleiche Sensitivität ihrer  $N_2O$ -Reduktase gegenüber NO. Während in  $N_2O$ -Zellen bereits durch 10 mbar NO Partialdruck totale Inaktivierung der  $N_2O$ -Reduktase eintrat, blieben anaerob, in Nitratmedium gezogene (Nitratzellen) von dieser Konzentration unbeeinträchtigt (Abb. 11).

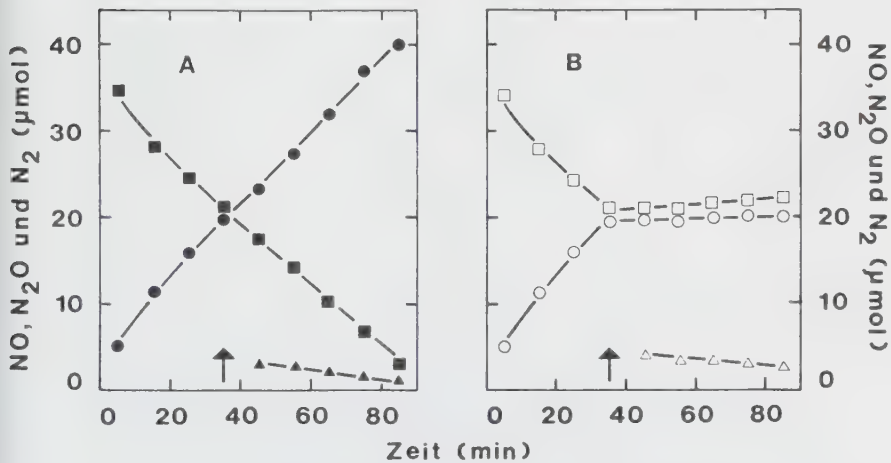


Abb. 11 Vergleich der NO-Sensitivität der  $N_2O$ -Reduktase in Nitrat-Zellen und  $N_2O$ -Zellen

*Pseudomonas perfectomarinus* wurde in Asparagin-Citrat Medium unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat (Abb. 11A) oder  $N_2O$  (Abb. 11B) angezogen. In zwei Parallelansätzen wurde die  $N_2O$  Reduktion gaschromatographisch gemessen. Nach 35 min wurde in beide Reaktionsgefäße je 4.17  $\mu\text{mol}$  NO injiziert.

11A: Nitratzellen, 2.81 mg Zellprotein;  $N_2O$  (■),  $N_2$  (●), NO (▲).

11B:  $N_2O$  Zellen, 5.85 mg-Zellprotein;  $N_2O$  (□),  $N_2$  (○), NO (△).

Die  $N_2O$ -Reduktase von Nitrat- und  $N_2O$  Zellen wurde auf etwaige Sensitivitätsunterschiede gegenüber verschiedenen Substanzen, deren Hemmwirkung auf die  $N_2O$ -Reduktion bekannt ist, getestet. Ein Vergleich der  $K_i$  Werte für NO und fünf andere Inhibitoren zeigt, daß beide Zelltypen außer auf NO nur noch auf Azid-Ionen mit signifikant unterschiedlicher Empfindlichkeit reagieren (Tab. 4).

Tabelle 4

$K_i$ -Werte von Hemmstoffen der  $N_2O$ -Reduktase: Ein Vergleich zwischen Nitratzellen und  $N_2O$ -Zellen von Ps. perfectomarinus

| Hemmstoff         | $K_i$ -Werte       |                    |
|-------------------|--------------------|--------------------|
|                   | Nitratzellen       | $N_2O$ -Zellen     |
| NO <sup>(1)</sup> | 55 $\pm$ 6 mbar    | 3.5 $\pm$ 1.5 mbar |
| Acetylen          | 1.5 $\pm$ 0.5 mbar | 1.0 $\pm$ 0.5 mbar |
| Sauerstoff        | 20 mbar            | 20 mbar            |
| Azid              | 100 $\mu$ M        | 40 $\mu$ M         |
| Cyanid            | 5 $\mu$ M          | 5 $\mu$ M          |
| 2,4-Dinitrophenol | 35 $\mu$ M         | 35 $\mu$ M         |

(1) Die angegebenen Werte beziehen sich auf 11 mg Zellprotein in 3 ml Testlösung. Wegen der Proteinabhängigkeit der Hemmung (siehe S. 60) dürfen die für NO angegebenen Werte nicht als  $K_i$  bezeichnet werden.

### 3.2.2. REVERSIBLE UMSCHALTUNG DES ELEKTRONENFLUSSES VON $N_2O$ AUF $O_2$

Neben der Repressorfunktion auf die Enzymsysteme der Denitrifikation besitzt  $O_2$  auch auf regulatorischer Ebene Bedeutung für die  $N_2O$ -Reduktase durch reversible Hemmung der Enzymaktivität. Die  $O_2$  Hemmung wurde kinetisch erfährt. Nach der Injektion von Luftsauerstoff in einen Testansatz einer  $N_2O$  reduzierenden Zellsuspension wurde die Atmung innerhalb von 2 min von  $N_2O$  auf  $O_2$  Reduktion umgeschaltet (Abb. 12). Der umgekehrte Vorgang, die Rückschaltung des

Elektronenflusses auf  $\text{N}_2\text{O}$  benötigt ebenfalls nur wenige min, wobei  $\text{O}_2$  und  $\text{N}_2\text{O}$  nach dem Absinken des  $\text{O}_2$  Partialdruckes auf etwa 10 mbar gleichzeitig als Elektronenakzeptoren verwendet werden.

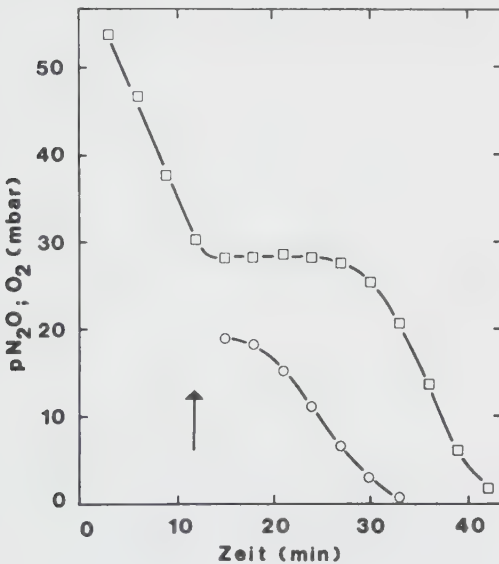


Abb. 12 Kinetik der reversiblen Umschaltung der Zellatmung von  $\text{N}_2\text{O}$  auf  $\text{O}_2$  in  $\text{N}_2\text{O}$ -Zellen von Pseudomonas perfectomarinus

In einem Testansatz wurde die  $\text{N}_2\text{O}$  Respiration in intakten Zellen durch die Zugabe des Elektronenakzeptors gestartet. Nach 12 min erfolgte die Injektion von 900  $\mu\text{l}$  Luft (Pfeil).

Die Partialdrucke von  $\text{N}_2\text{O}$  (□) und  $\text{O}_2$  (○) wurden gaschromatographisch bestimmt. Der Testansatz enthielt 8.1 mg Zellprotein.

Der rasche Übergang von aerober Atmung auf anaerobe  $\text{N}_2\text{O}$  Respiration wurde unabhängig von dieser kinetischen Untersuchung der Aufnahme von Elektronenakzeptoren auch spektralphotometrisch durch die Messung der Veränderung von Oxidationszuständen der Zellcytochrome verfolgt (Abb. 14, S. 53).

Unter Helium in gasdicht verschlossenen Küvetten inkubierte Zellsuspensionen wurden mit Na-Lactat reduziert. Die Absorptionsspektren der mit Lactat reduzierten Proben dienten als Referenz für Differenzmessungen der Oxidationszustände der Zellcytochrome (Abb. 13). Nach der Entfernung des rest-

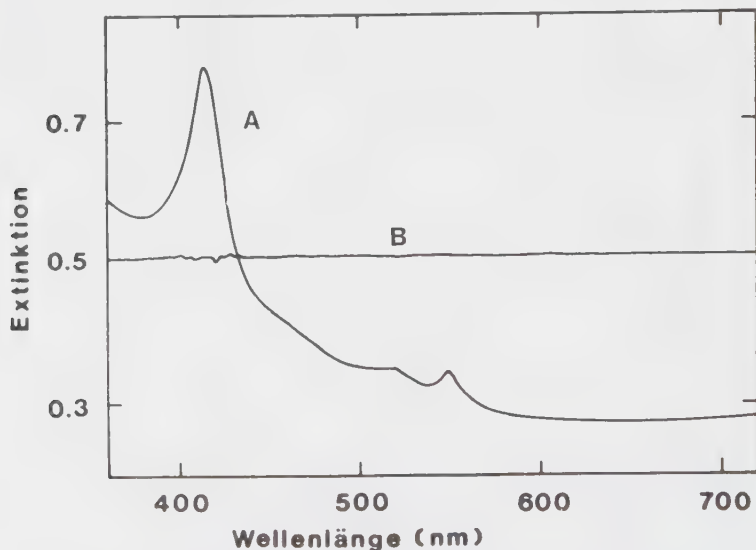


Abb. 13 Absorptionsspektrum einer mit Lactat reduzierten Zellsuspension von Ps. perfectomarinus

In einer gasdicht verschlossenen Küvette wurden 2 ml Zellsuspension in 50 mM Phosphatpuffer, pH 7.0 mit 150  $\mu$ mol Na-Lactat unter Helium inkubiert. Die Proteinmenge betrug 2.1 mg. Das Absorptionsspektrum (A) dieser Probe wurde aufgezeichnet und abgespeichert. Zur Kontrolle der Stabilität der Zellsuspension während der Verfolgung der  $O_2$  Atmung wurde am Ende des Versuches die Differenz aus gemessenem, Lactat reduzierten Spektrum minus dem gespeicherten Absorptionsspektrum aufgezeichnet (Differenzspektrum B).

lichen, nicht veratmeten  $O_2$  durch Evakuieren der Küvette fiel die Absorptionsdifferenz bei 420 nm wieder auf das

Niveau des reduzierten Zustandes zurück und erreichte wenige Sekunden nach der Injektion von  $N_2O$  die in einem Kontrollansatz, der nur mit  $N_2O$  inkubiert worden war gemessene Oxidationshöhe (Abb. 14).

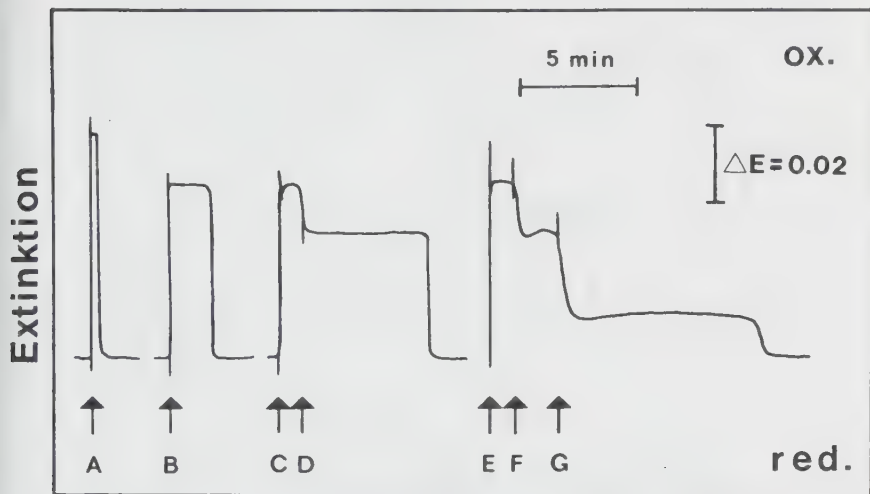


Abb. 14 Wirkung verschiedener Elektronenakzeptoren auf die spektrale Absorption einer Suspension von Nitratzellen bei 420 nm.

2.0 ml einer Suspension von Nitratzellen (2.1 mg Gesamtprotein) wurde in gleicher Weise wie unter Abb. 13 dargestellt inkubiert. Der Testansatz wurde nacheinander mit verschiedenen Elektronenakzeptoren versehen: A, 20  $\mu$ l O<sub>2</sub>; B, 50  $\mu$ l N<sub>2</sub>O; C, 50  $\mu$ l N<sub>2</sub>O; D, 50  $\mu$ l NO; E, 50  $\mu$ l N<sub>2</sub>O; F, 50  $\mu$ l NO; G, 100  $\mu$ l NO. Vor den N<sub>2</sub>O Injektionen wurde der Gasraum evakuiert und erneut mit Helium gefüllt. Die Änderungen der Differenzabsorption zwischen der durch Lactat reduzierten Probe minus der oxidierten Suspensionen wurden aufgezeichnet.

### 3.2.3. REVERSIBLE UND IRREVERSIBLE HEMMUNG DURCH NO

Ein weiterer Unterschied im Verhalten der N<sub>2</sub>O-Reduktase gegenüber NO in beiden Zelltypen ist die Reversibilität bzw. die Irreversibilität der Hemmung nach Entfernung des Inhibitors (Abb. 15). Während die Hemmung der

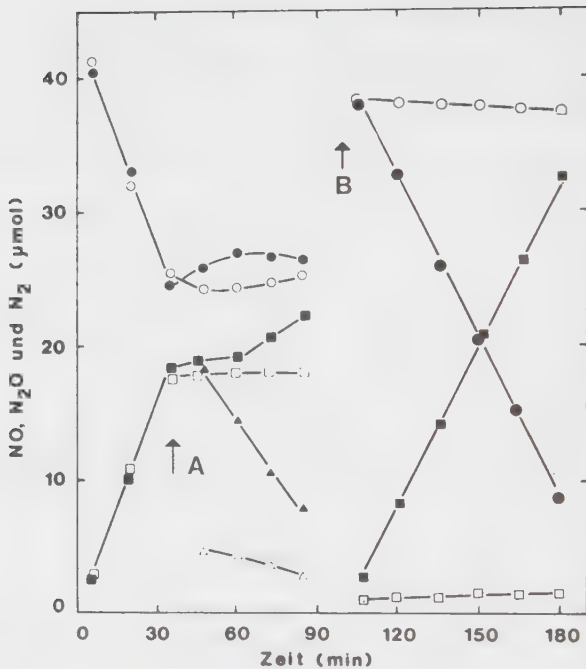


Abb. 15 Reversibilität der Hemmung der N<sub>2</sub>O-Reduktase durch NO in Nitratzellen und Irreversibilität in N<sub>2</sub>O Zellen

Nitratzellen (1.3 mg Protein) und N<sub>2</sub>O-Zellen (2.4 mg Protein) wurden getrennt unter den bereits beschriebenen Bedingungen inkubiert. Der Start der Reaktionen erfolgte durch Injektion von je 1 ml N<sub>2</sub>O (entsprechend 110 mbar) zu den Testansätzen. Nach 35 min wurden 500 μl NO zum Nitratzellen Ansatz und 100 μl NO zum N<sub>2</sub>O-Zellen Ansatz hinzugefügt (Pfeil A). Nach 90 min wurden in beiden Reaktionsgefäßen die Gasräume zehnmal evakuiert und mit Helium gefüllt. Erneuter Start der Reaktionen erfolgte nach 100 min (Pfeil B) durch je 1 ml N<sub>2</sub>O. Symbole: Nitratzellen: N<sub>2</sub>O, ●; NO, ▲; N<sub>2</sub>, ■. N<sub>2</sub>O-Zellen: N<sub>2</sub>O, ○; NO, △; N<sub>2</sub>, □.

$\text{N}_2\text{O}$ -Reduktase durch über 50 mbar NO in Nitratzellen nach dem Evakuieren der Testgefäße aufgehoben wurde, blieb die Inaktivierung selbst durch eine 5-fach niedrigere NO Konzentration in  $\text{N}_2\text{O}$ -Zellen auch nach der Entfernung des NO bestehen (Abb. 15). Zur Erleichterung des direkten, quantitativen Vergleiches des Verhaltens beider Zelltypen wurde die Anfangsgeschwindigkeit der  $\text{N}_2\text{O}$  Aufnahme durch Anpassung der Zellmengen auf die gleiche Rate eingestellt. Wie in Abb. 11 ist auch hier wieder die höhere spezifische NO-Reduktaseaktivität der Nitratzellen zu erkennen.

Die Ergebnisse der spektralphotometrischen Untersuchungen bestätigen die unterschiedliche Reaktion der  $\text{N}_2\text{O}$ -Reduktase auf die Einwirkung von NO in beiden Zelltypen. In Nitratzellen (starke NO-Reduktase) sinkt der Oxidationslevel der durch  $\text{N}_2\text{O}$  oxidierten Cytochrome nach Inkubation unter 29 mbar NO (50  $\mu\text{l}$ ) um knapp 30% (Abb. 14, nach Injektion D). Da Nitratzellen im Vergleich zu  $\text{N}_2\text{O}$ -Zellen relativ hohe spezifische NO-Reduktaseaktivität besitzen liegt das Oxidationsniveau in Abhängigkeit vom NO Partialdruck zwischen dem ursprünglichen, durch  $\text{N}_2\text{O}$  hervorgerufenen Wert und dem niedrigeren durch NO Reduktion verursachten steady state. Nach der vollständigen Entfernung des NO aus dem Reaktionsraum durch Reduktion oder durch Austausch des Gasraumes, erreicht der Oxidationslevel von Nitratzellen nach der Injektion von  $\text{N}_2\text{O}$  wieder den Anfangswert, der vor dem Kontakt mit NO gemessen wurde (Abb. 14, nach Injektion E). Steht den Zellen weder NO noch  $\text{N}_2\text{O}$  als Elektronenakzeptor zur Verfügung, so nehmen die Cytochrome auch nach der Einwirkung von NO wieder den reduzierten steady state ein (Abb. 14, nach der letzten Injektion). Für Nitratzellen ist die Hemmung der  $\text{N}_2\text{O}$ -Reduktase auch im Bereich der in den Elektronentransport eingeschalteten Cytochrome reversibel.

In  $\text{N}_2\text{O}$ -Zellen hingegen fällt der durch  $\text{N}_2\text{O}$  in den oxidierten Zustand versetzte steady state level nach Inku-

bation unter dem gleichen NO Partialdruck von 29 mbar (entsprechend 50  $\mu$ l NO Injektion) innerhalb von Sekunden auf das reduzierte Niveau zurück (Abb. 16). Die gleiche NO-Konzentration hemmt die Oxidation der an der  $N_2O$ -Reduktion beteiligten Cytochrome in  $N_2O$ -Zellen stärker als in Nitratzellen (vergl. Abb. 16 mit Abb. 14).

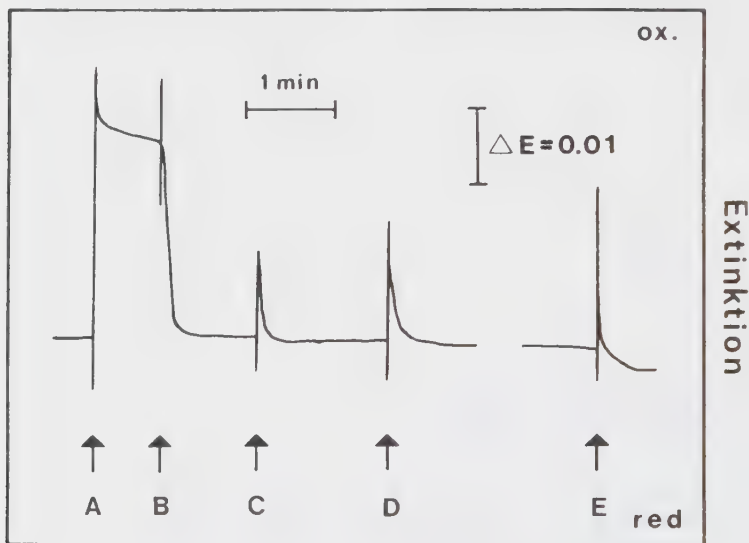


Abb. 16 Änderung der spektralen Absorption einer Suspension von  $N_2O$ -Zellen bei 420 nm als Funktion der zugefügten Elektronenakzeptoren

2 ml einer Suspension von  $N_2O$ -Zellen (Proteingehalt, 2.1 mg) wurde wie bereits unter Abb. 13 beschrieben inkubiert. Die Pfeile kennzeichnen die Zeitpunkte der Injektionen von NO und  $N_2O$ : A, 50  $\mu$ l  $N_2O$ ; B, 50  $\mu$ l NO; C, D und E, je 200  $\mu$ l  $N_2O$ . Vor Injektion E wurde die Gasatmosphäre ausgetauscht. Die zeitliche Veränderung der Differenz aus den Absorptionen bei 420 nm von oxidiertem minus durch Lactat reduzierte Probe wurde aufgezeichnet.

Die Erhöhung der  $N_2O$  Konzentration um den Faktor 5 bewirkt auch keine partielle Reoxidation der Cytochrome. Die Entfernung des NO durch Austausch der Atmosphäre im Testansatz und anschließende Zuführung von  $N_2O$  führt ebenfalls nicht zur Reoxidation. Durch die Inkubation der  $N_2O$ -Zellen mit NO wurde die  $N_2O$ -Reduktion irreversibel gehemmt. Die in diesem Zelltyp sehr schwache NO-Reduktase bewirkt hier im Gegensatz zu den Nitratzellen keine Anhebung des reduzierten steady state durch NO-Reduktion.

### 3.2.4. ANGRIFFSPUNKT DER NO HEMMUNG

In keinem der beiden untersuchten Zelltypen von Pseudomonas perfectomarinus wurde durch NO die Reduktion der am Elektronentransport zur  $N_2O$ -Reduktase beteiligten Cytochrome gehemmt. Unterbrochen wurde die Reoxidation durch Übertragung von Elektronen auf  $N_2O$  in  $N_2O$ -Zellen (Abb. 16).

Die Injektion von Luftsauerstoff in Suspensionen von  $N_2O$ -Zellen, deren  $N_2O$ -Reduktase vorher mit NO gehemmt worden war und deren Cytochrome sich deshalb im reduzierten steady state befanden, bewirkte die Oxidation der Cytochrome innerhalb weniger Sekunden. Im Gegensatz zu einem Kontrollansatz, der vorher nicht mit NO inkubiert worden war, blieb in der mit NO behandelten Probe der oxidierte Zustand für mehr als 20 min bestehen (vergl. Abb. 14). Der Übergang in die reduzierte Form erfolgte anschließend innerhalb weniger Sekunden.

Um die oben dargestellten Ergebnisse zu überprüfen und um sicher zu stellen, daß die Hemmung der  $N_2O$ -Reduktase durch NO nicht im Bereich der Substratoxidation einzuordnen ist, wurde folgendes Experiment mit Nitratzellen unternommen: Eine Zellsuspension wurde 15 min unter Luftsauerstoff gerührt, um Reste an endogenem Substrat aufzubrauchen.

Ein Kontrollspektrum dieser Zellen nach Inkubation unter Helium zeigte, daß die Cytochrome im oxidierten Zustand vorlagen. Der Suspension wurden nun 170  $\mu\text{l}$  NO (entspricht hier 100 mbar) zugesetzt. Anschließend wurden 150  $\mu\text{mol}$  Na-Lactat injiziert. Die Zellcytochrome nahmen darauf innerhalb von 20 s wieder die reduzierte Form an.

### 3.2.5. MECHANISMUS DER HEMMUNG DER $\text{N}_2\text{O}$ -REDUKTION DURCH NO

Die Frage nach dem Mechanismus der Inaktivierung der  $\text{N}_2\text{O}$ -Reduktase durch NO wurde mit Hilfe zweier, voneinander unabhängiger Methoden untersucht. Die  $\text{N}_2\text{O}$ -Reduktionsrate von  $\text{N}_2\text{O}$ -Zellen (schwache NO-Reduktase) wurde bei konstantem NO Partialdruck von 3.33 mbar in Abhängigkeit vom  $\text{N}_2\text{O}$  Partialdruck (zwischen 56 und 224 mbar) gemessen (Tab. 5).

Tabelle 5

Hemmung der  $\text{N}_2\text{O}$ -Reduktion durch NO als Funktion des  $\text{N}_2\text{O}$  Partialdruckes in  $\text{N}_2\text{O}$ -Zellen

| $\text{N}_2\text{O}$ Partialdruck<br>(mbar) | $\text{N}_2\text{O}$ Aufnahme<br>( $\mu\text{mol/h}$ ) |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 56                                          | 6.28                                                   |
| 112                                         | 6.35                                                   |
| 170                                         | 5.91                                                   |
| 224                                         | 6.03                                                   |

Die Testansätze enthielten je 2.4 mg Zellprotein. Der NO Partialdruck wurde auf 3.33 mbar eingestellt.

die Messung der Umsatzraten keinen Aufschluß über den Mechanismus der NO-Hemmung, da wegen der starken NO-Reduktion in die-

Sie betrug in allen Ansätzen etwa 6  $\mu\text{mol}$  pro Stunde. Dieses Resultat schließt ebenso wie die Irreversibilität der Hemmung in  $\text{N}_2\text{O}$ -Zellen einen kompetitiven Mechanismus aus. Die spektralphotometrischen Messungen an  $\text{N}_2\text{O}$ -Zellen (Abb. 16) bestätigen dies. Dort konnte nach der Hemmung der  $\text{N}_2\text{O}$ -Reduktase durch 50  $\mu\text{l}$  NO die Steigerung der  $\text{N}_2\text{O}$ -Konzentration um das Dreifache keine Reaktivierung des Enzymes bewirken. Für Nitratzellen (starke NO-Reduktase) ergab

sem Zelltyp Interferenzen zwischen  $N_2O$  Produktion aus der Hemmstoffreduktion und  $N_2O$ -Reduktion aus der  $N_2O$ -Reduktase-aktivität auftraten. Die Verringerung der NO Konzentration hatte zudem Aktivitätssteigerungen der  $N_2O$ -Reduktase während der Experimente zur Folge. Die spektralphotometrischen Aufzeichnungen der Absorption bei 420 nm lassen auf einen nicht kompetitiven Mechanismus der Hemmung auch in Nitratzellen schließen (Abb. 17).

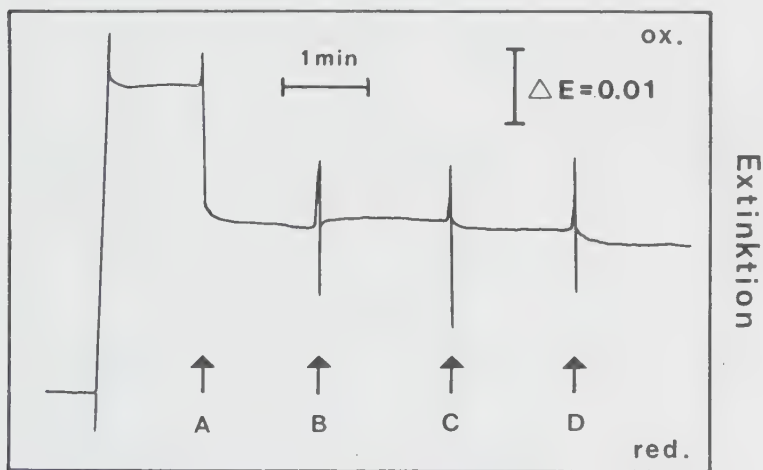


Abb. 17 Fehrender kompetitiver Effekt von  $N_2O$  auf die NO-Hemmung der  $N_2O$ -Reduktase in Nitratzellen  
Nitratzellen (1.9 mg Protein) wurden unter Helium wie bereits dargestellt inkubiert. Zu Beginn wurden 100  $\mu$ l  $N_2O$  injiziert. Dies entspricht einem Partialdruck von 59 mbar. Nach dem Anstieg der Absorptionsdifferenz Lactat (red.) -  $N_2O$  (ox.) erfolgten im Abstand von jeweils etwa 1.5 min<sup>2</sup> die Zufuhr von je 100  $\mu$ l an: NO, (A);  $N_2O$ , (B);  $N_2O$ , (C);  $N_2O$ , (D). Die zeitliche Änderung der Absorptionsdifferenz wurde aufgezeichnet.

Die  $N_2O$ -Reduktion wurde durch 59 mbar NO Partialdruck um etwa 50% gehemmt. Dies entspricht ungefähr der in Tabelle 4 wiedergegebenen Konzentration, die zur halbmaximalen Inhibition

der  $N_2O$ -Reduktase in Nitratzellen durch direkte Messung der Reaktionsumsätze ermittelt wurde. Die Steigerung des  $N_2O$  Partialdruckes durch wiederholte Injektion von  $N_2O$  bis zum vierfachen der Startkonzentration ergab keinen Anstieg der Absorptionsdifferenz der Zellsuspension, der beim Vorliegen einer kompetitiven Hemmung zu erwarten wäre.

Bei konstantem NO Partialdruck erwies sich die Hemmung der  $N_2O$ -Reduktase in  $N_2O$ -Zellen abhängig von der Zellproteinkonzentration in den Testansätzen (Tab. 6).

Tabelle 6

Die Hemmung der  $N_2O$ -Reduktase durch NO ist abhängig von der Zellproteinmenge im Testansatz

| Zellprotein <sup>(1)</sup><br>(mg) | $N_2O$ Reduktion<br>( $\mu\text{mol/h}$ ) |                | Hemmung<br>(%) |
|------------------------------------|-------------------------------------------|----------------|----------------|
|                                    | Kontrolle                                 | + 3.33 mbar NO |                |
| 0.8                                | 6.8                                       | 0.7            | 90             |
| 1.6                                | 12.9                                      | 6.9            | 47             |
| 3.2                                | 25.0                                      | 19.4           | 22             |

(1) intakte  $N_2O$ -Zellen

Bei konstantem NO Partialdruck betrug die Inaktivierung der  $N_2O$ -Reduktase zwischen 90 % bei geringster und 22 % bei höchster Zelldichte und verhielt sich somit umgekehrt proportional zur vorliegenden Zellmenge. Dieses Ergebnis steht ebenfalls nicht im Einklang mit einem kompetitiven Hemmechanismus. An Nitratzellen wurde ein gleichartiges Experiment aus den bereits genannten Gründen nicht durchgeführt.

### 3.3. UNVOLLSTÄNDIGE NITRITREDUKTION ALS FOLGE DER REPRESSION DER NO-REDUKTASE DURCH SAUERSTOFF UND DER HEMMUNG DER $N_2O$ -REDUKTASE DURCH NO

Als Folge der in den beiden vorhergehenden Abschnitten dargestellten Repression der Synthese der NO-Reduktase unter semiaeroben Bedingungen sowie der Hemmung der  $N_2O$ -Reduktion durch NO wird die Reduktion von Nitrit unter bestimmten Bedingungen bereits auf der Stufe des NO bzw. des  $N_2O$  abgebrochen (Tab. 7; siehe auch: Matsubara und Zumft, 1982).

Einige Bakterienstämme besitzen konstitutiv nur eine unvollständige Ausstattung an Denitrifikationsenzymen. Hierzu zählen: Pseudomonas aureofaciens, Pseudomonas chlororaphis B 560, Pseudomonas chlororaphis B 561 und Pseudomonas fluorescens PJ 188, Biotyp B.

Acht verschiedene Stämme von Pseudomonas, darunter die oben genannten unvollständigen Denitrifizierer, wurden unter semiaeroben Bedingungen als Schüttelkulturen in synthetischem Nitratmedium angezogen. Die gaschromatographisch ermittelten spezifischen Nitrit-, NO- und  $N_2O$ -Reduktaseaktivitäten wurden einander gegenübergestellt. Zusätzlich wurde auch noch die prozentuale Zusammensetzung der Produktgemische, die aus Nitrit entstanden, bestimmt.

Obwohl die spezifische  $N_2O$ -Reduktaseaktivität in Pseudomonas stutzeri, Pseudomonas fluorescens PJ 187 und Pseudomonas fluorescens DSM 50 111 sehr hoch lag, erschienen als Produkte der Nitritreduktion wie bei den unvollständigen Denitrifizierern überwiegend NO und  $N_2O$  neben geringen Anteilen von  $N_2$  (Tab. 7).

Eine Ausnahme bildete Pseudomonas perfectomarinus, der Nitrit vollständig zu  $N_2$  denitrifizierte. Unter allen hier verwendeten Organismen besaß er die mit Abstand höchste spezifische NO-Reduktaseaktivität.

Tabelle 7

Produkte der dissimilatorischen Nitritreduktion in einigen Pseudomonadenstämmen

| Organismus                                | Spezifische Aktivität<br>( $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) |                |                                  | Produkte der $\text{NO}_2^-$ Reduktion<br>(%) |                      |              |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|----------------|----------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------|--------------|
|                                           | $\text{NO}_2^-$<br>Aufnahme                                         | NO<br>Aufnahme | $\text{N}_2\text{O}$<br>Aufnahme | NO                                            | $\text{N}_2\text{O}$ | $\text{N}_2$ |
| <i>P. perfectomarinus</i> , ATCC 14 405   | 3.0                                                                 | 1.9            | 11.1                             | 0                                             | 0                    | 100          |
| <i>P. stutzeri</i> , JM 300               | 2.6                                                                 | —              | 10.4                             | 88                                            | 11                   | 1            |
| <i>P. fluorescens</i> , PJ 187, Biotype B | 4.0                                                                 | —              | 19.7                             | 85                                            | 10                   | 5            |
| <i>P. fluorescens</i> , PJ 188, Biotype B | 1.7                                                                 | 0.3            | 0.4                              | 90                                            | 2                    | 8            |
| <i>P. fluorescens</i> , DSM 50 111        | 3.4                                                                 | —              | 28.1                             | 100                                           | 0                    | 0            |
| <i>P. chlororaphis</i> , B 560            | 0.8                                                                 | —              | 0.0                              | 88                                            | 12                   | 0            |
| <i>P. chlororaphis</i> , B 561            | 3.9                                                                 | —              | 0.0                              | 10                                            | 90                   | 0            |
| <i>P. aureofaciens</i> , ATCC 13 985      | 2.1                                                                 | 0.6            | 0.0                              | 100                                           | 0                    | 0            |

Die Anzucht wurde unter semiaeroben Bedingungen (1 l Medium in 2 l Erlenmeyerkolben bei einer Schüttelfrequenz von 120/min) in synthetischem Nitratmedium vorgenommen.

Mit Pseudomonas stutzeri wurde die Kinetik der Nitritreduktion durch intakte Zellen, die unter semiaeroben Bedingungen in synthetischem Nitratmedium angezogen wurden gemessen (Abb. 18 A). Lediglich während der ersten 15 min, als die NO Konzentration noch sehr niedrig lag, wurden geringe  $N_2O$  Mengen produziert. Die Entstehung von  $N_2$  konnte selbst dann nicht beobachtet werden, als nach 75 min 42  $\mu\text{mol}$   $N_2O$  (entspricht hier 110 mbar) injiziert wurden. Zellen aus der gleichen Kultur reduzierten jedoch  $N_2O$  mit hoher Geschwindigkeit zu  $N_2$  (Abb. 18 B).

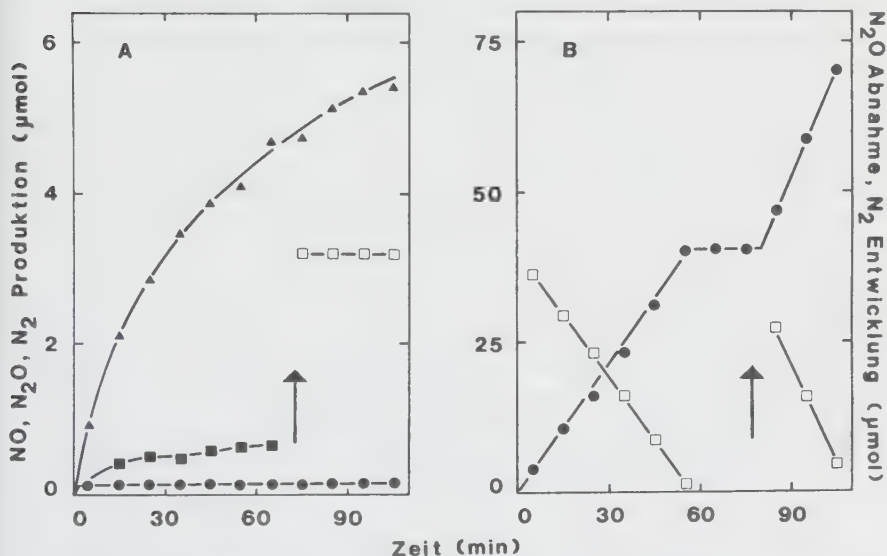


Abb. 18 Kinetik der Nitrit- und  $N_2O$ -Reduktion durch intakte Zellen von Pseudomonas stutzeri, JM 300

Semiaerob in synthetischem Nitratmedium gezogene Zellen (je 4.1 mg Protein) wurden unter Helium inkubiert. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zusatz von 40  $\mu\text{mol}$   $\text{NaNO}_2$  (18 A) bzw. 42  $\mu\text{mol}$   $N_2O$  (18 B). Nach jeweils 75 min wurden in beide Ansätze 42  $\mu\text{mol}$   $N_2O$  injiziert. Für  $N_2O$  in Abb. 18 A gilt ab jetzt die  $N_2O$  Skala der Abb. 3B. Symbole: NO,  $\blacktriangle$ ;  $N_2O$  prod.,  $\blacksquare$ ;  $N_2O$  add.,  $\square$ ;  $N_2$ ,  $\bullet$ .

### 3.4. RICHTUNG DES ELEKTRONENTRANSPORTES ZUR $N_2O$ -REDUKTASE VON B CYTOCHROMEN ZU C CYTOCHROMEN

In Paracoccus denitrificans (Boogerd et al., 1980) und in einem Stamm aus der Gattung Alcaligenes (Matsubara, 1975) sind b- und c-Cytochrome am Elektronentransport zur  $N_2O$ -Reduktase beteiligt.  $N_2O$ -Zellen von Pseudomonas perfectomarinus wurden unter Helium in Phosphatpuffer (pH 7) mit Lactat inkubiert. Nach der Injektion von 100  $\mu$ l  $N_2O$  gingen die Cytochrome in ihre oxidierte Form über (Abb. 19A), während  $N_2O$  zu  $N_2$  reduziert wurde. Nachdem gaschromatographisch kein  $N_2O$  mehr nachgewiesen werden konnte, wurde ein zweites Differenzspektrum der Zellsuspension aufgezeichnet (Abb. 19 B).

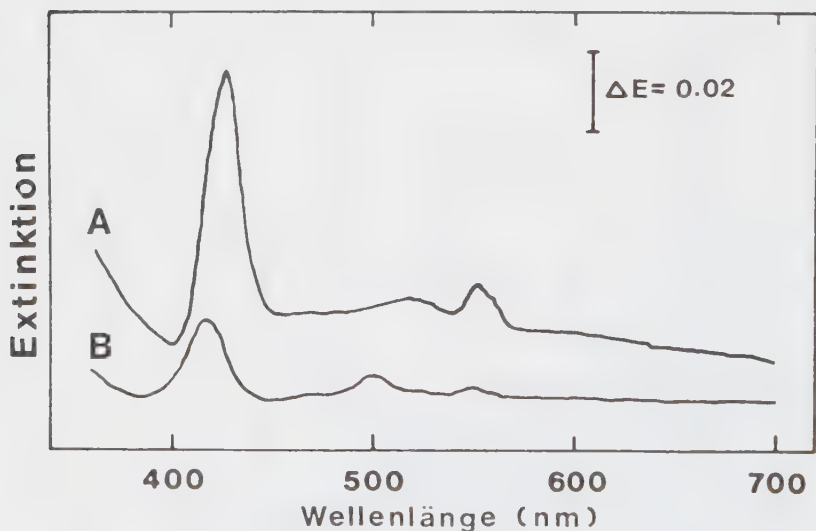


Abb. 19 Sequentielle Rereduktion von b- und c-Cytochromen  
 $N_2O$ -Zellen (2.7 mg Zellprotein) wurden unter Helium inkubiert und mit Na-Lactat reduziert. Danach erfolgte der Start der  $N_2O$ -Reduktion durch Injektion von 100  $\mu$ l des Substrates. Kontinuierliche Differenzspektren (Lactat red. minus  $N_2O$  ox.) wurden 1 min nach dem Start (A) und nach vollständiger Reduktion des  $N_2O$  zu  $N_2$ , 15 min nach dem Start (B) aufgezeichnet.

Der Shift der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Absorptionsbanden hin zu kürzeren Wellenlängen im Spektrum 19 B, nach erfolgter, quantitativer Reduktion des  $N_2O$  deutet darauf hin, daß b-Cytochrome bereits vor den c-Cytochromen durch Lactat rereduziert wurden. In der Elektronentransportkette vom Lactat zur  $N_2O$ -Reduktase müssen deshalb Cytochrome vom Typ b vor c-Cytochromen stehen.

### 3.5. ENZYMATISCHE UND NICHT ENZYMATISCHE ASCORBAT ABHÄNGIGE REDUKTION VON NO ZU $N_2O$

Die Eigenschaften der respiratorischen Nitritreduktion durch eine cytoplasmatische Membranfraktion von Pseudomonas perfectomarinus wurden von Zumft und Vega (1979) beschrieben. Unter Verwendung von Ascorbat und PMS oder NADH und FMN sind diese Membranfraktionen in der Lage, Nitrit und NO zu  $N_2O$  zu reduzieren. Im Laufe der Untersuchungen zur Charakterisierung der membrangebundenen NO-Reduktase stellte sich heraus, daß die Reaktionsgeschwindigkeit in Gegenwart katalytischer Konzentrationen von Fe(II)Salzen erheblich gesteigert wurde, und daß selbst in Abwesenheit von Membranvesikeln in beträchtlichem Umfang  $N_2O$  produziert wurde (Tab. 8).

Im folgenden Abschnitt wird die Charakterisierung der enzymatischen, membrangebundenen NO-Reduktase und die der nicht enzymatischen, chemischen Reduktion vorgenommen. Es wird gezeigt, wie durch gezielte Ausnutzung spezifischer Eigenschaften beider Prozesse die Überlagerung der physiologischen NO-Reduktion durch die gleichartige chemische Reaktion umgangen bzw. ausgeschaltet werden kann (Zumft und Frunzke, 1982).

Tabelle 8

Enzymatische und nicht enzymatische Reduktion von NO zu  $N_2O$

Die Testansätze enthielten in 3 ml Tris/HCl, 133  $\mu M$ , pH 7.5: 50  $\mu mol$  Na-Ascorbat und 0.5  $\mu mol$  PMS oder 50  $\mu mol$  NADH und 1 mg FMN; 3  $\mu mol$   $FeSO_4$  (wo angezeigt); Die Testansätze mit Membranzusatz enthielten 11 mg Protein.

| Komponenten                     | $N_2O$ Produktion<br>(nmol/min) |
|---------------------------------|---------------------------------|
| PMS                             | 0                               |
| Ascorbat                        | 6                               |
| PMS + Ascorbat                  | 6                               |
| Ascorbat + Fe                   | 83                              |
| Fe                              | 9                               |
| PMS + Ascorbat + Membranen      | 152                             |
| PMS + Ascorbat + Fe + Membranen | 228                             |
| NADH                            | 0                               |
| FMN                             | 0                               |
| NADH + FMN                      | 130                             |
| NADH + FMN + Fe                 | 378                             |
| NADH + FMN + Membranen          | 329                             |
| NADH + FMN + Fe + Membranen     | 688                             |

Ascorbat/PMS und NADH/FMN wurden bisher in nahezu allen Arbeiten über dissimilatorische Nitrit- und NO-Reduktasen in zellfreien Systemen als künstliche Elektronendonoren eingesetzt (siehe Einleitung). Andere, von uns getestete Elektronendonoren erwiesen sich als ungeeignet. So betrug die Effizienz von Lactat, Pyruvat, Malat, Fumarat, Succinat, Citrat und Asparagin im Vergleich zu Ascorbat/PMS in allen Fällen weniger als 2% in Bezug auf die membrangebundene NO-Reduktaseaktivität.

### 3.5.1. CHARAKTERISIERUNG DER FE/ASCORBAT ABHÄNGIGEN NO-REDUKTASE

#### 3.5.1.1. WIRKUNG VERSCHIEDENER PUFFERSUBSTANZEN

Einige Puffersubstanzen, die zum Teil Komplexe mit Zwischengruppenmetallen ausbilden (Pope et al., 1980), wurden getestet, um festzustellen, ob die katalytische Aktivität des Fe/Ascorbat Systemes durch die Wahl eines geeigneten Puffers reduziert werden kann. Die Messungen erfolgten unabhängig vom  $pK_s$  der jeweiligen Substanzen bei pH 7.0 und konstanten Konzentrationen von 67 mM. Im Bedarfsfall wurden die pH Werte mit NaOH bzw. HCl eingestellt. Im Vergleich mit Tris/HCl Puffer zeigen nur noch Phosphat und Tricin signifikante Hemmwirkung. Beim Phosphat dürfte die Komplexbildung von Eisen-Ionen entscheidend sein (Tab. 9).

Tabelle 9

Wirkung einiger Puffersubstanzen auf die Aktivität des Fe/Ascorbat-Systemes

| Puffersubstanz | N <sub>2</sub> O Produktion<br>absolut (nmol/min) | N <sub>2</sub> O Produktion<br>relativ (%) |
|----------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Tris/HCl       | 211                                               | 100                                        |
| Phosphat (1)   | 33                                                | 16                                         |
| Tricin         | 48                                                | 23                                         |
| Imidazol       | 204                                               | 97                                         |
| TES            | 175                                               | 83                                         |
| HEPES          | 167                                               | 79                                         |
| MES            | 179                                               | 85                                         |
| MOPS           | 173                                               | 82                                         |

(1) Die Eisen-Ionen Konzentration von 1 mM wurde durch Ausfällen von schwer löslichen Phosphaten verringert.

### 3.5.1.2. pH PROFILE

Die pH Profile der nicht enzymatischen Nitritreduktion durch  $\text{Fe}^{2+}$ , der NO-Reduktion durch Fe/Ascorbat und der enzymatischen NO-Reduktion wurden einander gegenübergestellt (Abb. 20). Die drei Reaktionen besitzen unterschiedliche Optima.

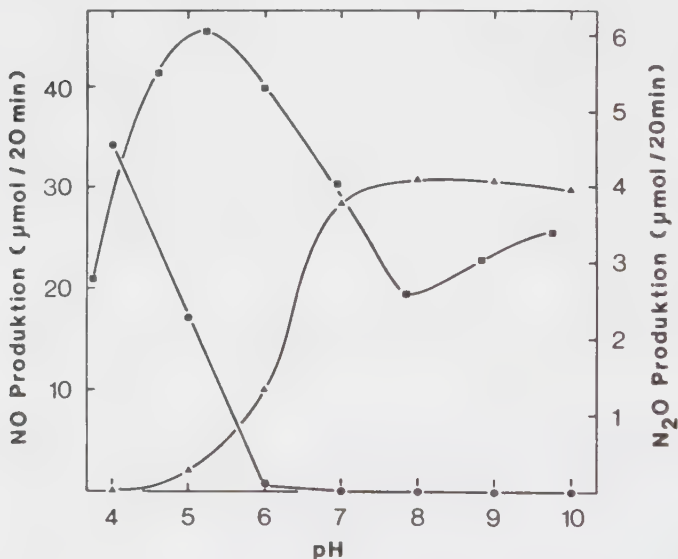


Abb. 20 pH Profile der Fe(II) /Ascorbat abhängigen Reduktionen von Nitrit zu NO und von NO zu  $\text{N}_2\text{O}$  sowie das der enzymatischen Reduktion von NO zu  $\text{N}_2\text{O}$  durch Membranfraktionen

Die Reaktionsansätze (3 ml) für die nicht enzymatischen Reduktionen enthielten ein Puffergemisch von je 200 μmol Glycin, TES, Tris und K-Phthalat, 3 μmol  $\text{FeSO}_4$  und 100 μmol Na-Ascorbat. Die Ansätze für die enzymatische Reaktion enthielten außer den Standardmengen an Ascorbat und PMS je 200 μmol Glycin, Hepes, Imidazol, K-Phthalat und  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Der Proteingehalt betrug je 4.1 mg. Die benötigten pH Werte wurden mit NaOH bzw. HCl eingestellt. Die Reaktionen wurden mit 100 μmol  $\text{NaNO}_2$  oder 41.7 μmol NO gestartet. Nicht enzymatische Bildung von NO aus Nitrit ●; nicht enzymatische Bildung von  $\text{N}_2\text{O}$  aus NO ▲; enzymatische Bildung von  $\text{N}_2\text{O}$  aus NO ■.

Der optimale Bereich für die chemische NO-Reduktion liegt als Plateauphase bei neutralem bis basischem pH und fällt unter pH 7 steil ab. Bei etwa pH 5.3 befindet sich das Maximum der enzymatischen NO-Reduktion. Die Nitritreduktion verläuft mit hohen Umsatzraten nur bei stark saurem pH und wurde zum Vergleich mit aufgenommen. Sie diente als Methode zur Synthese von  $N_2O$  freiem NO. Die Änderungen der pH Werte während der Reaktionen lagen bei Umsätzen bis  $30 \mu\text{mol}$  stets unter 0.3 pH Einheiten.

### 3.5.1.3. REAKTIONSGESCHWINDIGKEIT ALS FUNKTION DES NO PARTIALDRUCKES

Innerhalb eines Bereiches von 8 - 500 mbar (dies entspricht NO Konzentrationen in Lösung von 13 - 830  $\mu\text{M}$ ) ist die Reduktion erster Ordnung in Bezug auf NO (Abb.21).

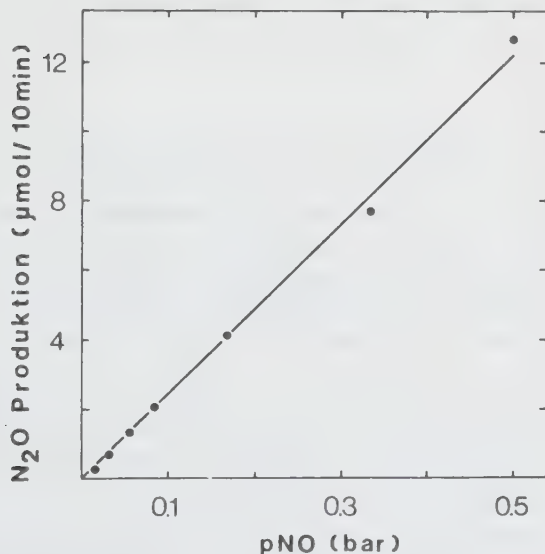


Abb. 21 Reaktionsgeschwindigkeit der Fe/Ascorbat abhängigen NO-Reduktion vom NO Partialdruck

Die Testansätze enthielten in 3 ml Tris/HCl Puffer 133  $\mu\text{M}$ , pH 7.2 100  $\mu\text{mol}$  Ascorbat und 3  $\mu\text{mol}$   $\text{FeSO}_4$ . Die Reaktionen wurden durch Injektion von NO gestartet.

Die geringe Wasserlöslichkeit des NO ist die Ursache dafür, daß unter den hier angewandten Bedingungen keine Substratsättigung der Reaktion erreicht wird. Der Bunsen'sche Absorptionskoeffizient beträgt bei 20 °C für NO 0.046.

### 3.5.1.4. DIE REAKTIONSGESCHWINDIGKEIT DER NO REDUKTION ALS FUNKTION DER Fe(II)-KONZENTRATION

Da die Fe/Ascorbat abhängige NO-Reduktion in Bezug auf das Substrat nicht gesättigt werden konnte, war es auch nicht möglich, die Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der Fe(II)-Salz Konzentration als einzigem Parameter darzustellen. Die Abhängigkeit von Fe(II) wurde aus diesem Grund bei drei unterschiedlichen NO Partialdrucken gemessen (Abb. 22). Die geringen Reaktionsraten in den Fe(II) freien Kontrollansätzen könnten auf Verunreinigungen der verwendeten Chemikalien zurückzuführen sein, da keine besonderen Maßnahmen zu deren spezifischen Reinigung von Fe getroffen wurden.

Die Abhängigkeit der Reaktion von der Fe(II) Konzentration zeigte biphasischen Charakter. Bei etwa 0.1 mM Fe(II) ist deutlich ein Knick der Kurve zu erkennen. Wahrscheinlich wird ab dieser Konzentration das Verteilungsgleichgewicht von NO zwischen flüssiger und Gasphase zum limitierenden Faktor, da die Löslichkeit von NO in wässrigen Systemen nur sehr gering ist (siehe oben).

Basierend auf den Daten aus Abb. 22 bei niedrigen Fe(II) Konzentrationen wurde als molare katalytische Aktivität für Fe(II) ein Wert von etwa  $0.1 \cdot \text{s}^{-1}$  bestimmt (bezogen auf die NO Aufnahme).

Von mehreren getesteten Zwischengruppenmetallen aus der 4. Periode ergab nur Cu(II) etwa 5 - 10 % der Aktivität, die unter gleichen Bedingungen mit Fe(II) erhalten wurde.

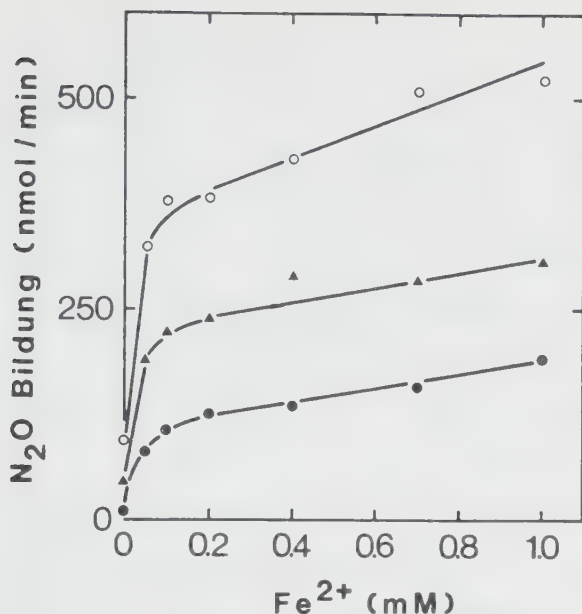


Abb. 22 Geschwindigkeit der Fe/Ascorbat abhängigen N<sub>2</sub>O Produktion aus NO als Funktion der Fe(II) Konzentration

Die Reaktionsansätze enthielten in 3 ml 0.133 mM Tris/HCl Puffer, pH 7.5 je 100 µmol Ascorbat. Die FeSO<sub>4</sub> Konzentration betrug zwischen 0 und 1 mM. 3 Reaktionsreihen wurden mit unterschiedlichen NO Partialdrucken gestartet: 42 mbar ● ; 82 mbar ▲ ; 167 mbar ○ .

### 3.5.1.5. VERÄNDERUNG DER SPEKTRALEN ABSORPTION DER REAKTIONSPHASE WÄHREND DER NO-REDUKTION

Die Farbe der Testansätze änderte sich stets von tief violett zu Beginn der Reaktion nach braun, wenn schon der überwiegende Teil des injizierten NO zu N<sub>2</sub>O reduziert war. Dies konnte spektralphotometrisch am Rückgang der Extinktion bei 540 nm gemessen werden (Abb. 23). Die Braunfärbung dürfte auf der Entstehung von Eisennitrosylkomplexen beruhen (Farbringtest).

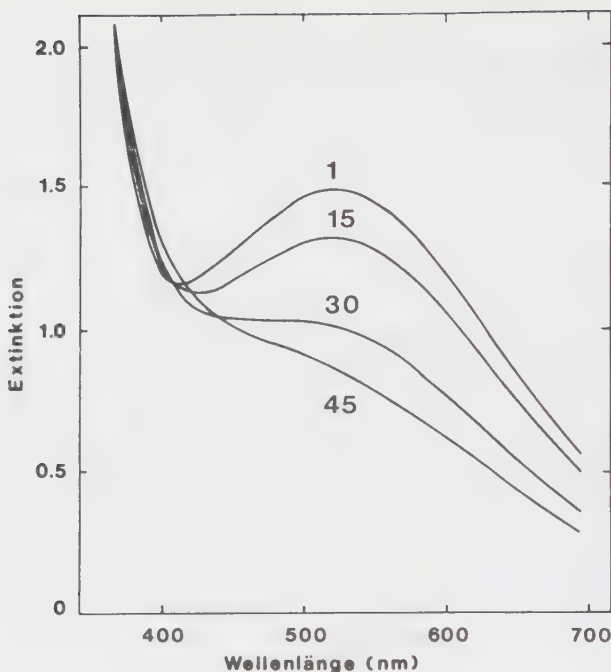


Abb. 23 Absorptionsänderung der Reaktionsphase während der NO-Reduktion durch Fe/Ascorbat

Der Testansatz enthielt in 3 ml 133 mM Tris/HCl Puffer, pH 7.5, 100  $\mu$ mol Ascorbat und 3  $\mu$ mol  $\text{FeSO}_4$ . Die Reaktion wurde mit 1 ml NO (110 mbar) gestartet. Nach 1, 15, 30 und 45 min wurden Absorptionsspektren der Reaktionsmischung aufgenommen. Nach 45 min waren über 90% des injizierten NO zu  $\text{N}_2\text{O}$  reduziert worden.

### 3.5.1.6. WIRKUNG VON METALLKOMPLEXBILDNERN AUF DIE AKTIVITÄT DES FE/ASCORBAT SYSTEMES

Da  $\text{Fe}^{2+}$  Kationen essentiell für die nicht enzymatische NO-Reduktion sind, wurden verschiedene Metallkomplexbildner auf hemmende oder aktivierende Wirkungen gegenüber dem Fe/Ascorbatsystem getestet (Tab. 10). Hervorzuheben ist die vollständige Inaktivierung der Katalyse durch die starken Eisenliganden Na-EDTA, Na-Diethyldithiocarbaminat und

2,2-Dipyridyl. Citrat und Cyanid verringerten die Reaktionsgeschwindigkeit um 67 bzw. 73 %. Thiocyanat und o-Phenanthrolin, die mit  $\text{Fe}^{3+}$  sehr stabile Komplexe bilden, zeigten keinen oder nur einen schwach inaktivierenden Effekt. Die relativ starke Hemmwirkung von Cystein könnte auf die Ausbildung von Sulfidbrücken mit  $\text{Fe}^{2+}$  zurückzuführen sein.

Tabelle 10

Effekt von Metalliganden auf die Reduktion von NO zu  $\text{N}_2\text{O}$  durch das Fe/Ascorbat System

| Ligand                     | $\text{N}_2\text{O}$ Produktion                     |     |
|----------------------------|-----------------------------------------------------|-----|
|                            | (nmol $\cdot$ min <sup>-1</sup> ) (% der Kontrolle) |     |
| keiner                     | 268                                                 | 100 |
| Na-Diethyldithiocarbaminat | 0                                                   | 0   |
| o-Phenanthrolin            | 172                                                 | 64  |
| Na-Citrat                  | 88                                                  | 33  |
| Na-EDTA                    | 0                                                   | 0   |
| 2,2-Dipyridyl              | 0                                                   | 0   |
| KF                         | 257                                                 | 96  |
| KCN                        | 72                                                  | 27  |
| KSCN                       | 265                                                 | 99  |
| Cystein                    | 40                                                  | 15  |
| Lysin                      | 306                                                 | 114 |
| Histidin                   | 233                                                 | 86  |
| Asparagin                  | 324                                                 | 121 |
| Glycin                     | 276                                                 | 103 |

Die Konzentration der getesteten Liganden war 10 mM in 133 mM Tris/HCl Puffer, pH 7.2. Die Konzentration von  $\text{FeSO}_4$  betrug 1 mM, die von Ascorbat 33 mM.

### 3.5.1.7. STÖCHIOMETRIE DER NO-REDUKTION DURCH Fe/ASCORBAT

Die Daten aus Tabelle 11 zeigen, daß NO in Übereinstimmung mit der folgenden Gleichung zu  $N_2O$  reduziert wird:



Gaschromatographisch konnte außer  $N_2O$  kein anderes Reaktionsprodukt, insbesondere kein  $N_2$  nachgewiesen werden. Unabhängig von der gaschromatographischen Analyse wurde  $N_2O$  auch mit Hilfe der für dieses Gas charakteristischen IR Absorptionsbande bei  $2224\text{ cm}^{-1}$  identifiziert. Disproportionierung von NO in  $N_2O$  und  $NO_2$  wäre ebenso wenig mit den Daten aus Tabelle 11 vereinbar wie die stöchiometrische Bildung eines stabilen Nitrosylkomplexes.

Tabelle 11

Stöchiometrie der NO-Reduktion durch Fe/Ascorbat

Bedingungen: In 3ml 133 mM Tris/HCl Puffer, pH 7.0, waren enthalten: 100  $\mu\text{mol}$  Ascorbat und 3  $\mu\text{mol}$   $\text{FeSO}_4$ . Die Reaktionen wurden durch Injektion der vorgesehenen NO Mengen (2.08 - 16.7  $\mu\text{mol}$ ) gestartet.

| NO<br>( $\mu\text{mol}$ ) | Reaktionszeit 3 h             |                              | Reaktionszeit 15 h            |                              |
|---------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
|                           | $N_2O$<br>( $\mu\text{mol}$ ) | $N_2O$<br>(% des th. Wertes) | $N_2O$<br>( $\mu\text{mol}$ ) | $N_2O$<br>(% des th. Wertes) |
| 2.08                      | 0.89                          | 85.6                         | 0.9                           | 86.5                         |
| 4.17                      | 1.88                          | 90.2                         | 1.87                          | 89.7                         |
| 8.33                      | 4.04                          | 97.0                         | 3.99                          | 95.8                         |
| 16.7                      | 7.54                          | 90.3                         | 7.69                          | 92.1                         |

Nach Gleichung I werden für die NO-Reduktion  $2e^-$  für jedes produzierte  $N_2O$  Molekül benötigt. Die experimentellen Daten für eine Reaktionszeit von 12 h stehen im Einklang

mit diesem Wert und zeigen außerdem, daß auch die Elektronen aus den  $\text{Fe}^{2+}$  Ionen auf NO übertragen werden (Tab. 12).

Tabelle 12

Stöchiometrie des Elektronentransfers

Bedingungen: siehe Tab. 11

| Ascorbat<br>( $\mu\text{mol}$ ) | $\text{Fe}^{2+}$<br>( $\mu\text{mol}$ ) | $\text{e}^-$ total<br>( $\mu\text{mol}$ ) | $\text{N}_2\text{O}$ Produktion |                                 | $\text{e}^-/\text{N}_2\text{O}$<br>(12 h) |
|---------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------|
|                                 |                                         |                                           | 2 h<br>( $\mu\text{mol}$ )      | 12 h (1)<br>( $\mu\text{mol}$ ) |                                           |
| 2.5                             | 5                                       | 10                                        | 3.66                            | 5.05                            | 1.98                                      |
| 5.0                             | 5                                       | 15                                        | 5.41                            | 8.15                            | 1.84                                      |
| 10.0                            | 5                                       | 25                                        | 8.06                            | 12.5                            | 2.0                                       |

(1)

Die Reaktion war nach 12 h beendet. Danach war keine weitere  $\text{N}_2\text{O}$  Produktion mehr festzustellen.

### 3.5.1.8. KINETIK DER NO-REDUKTION DURCH FE/ASCORBAT

Die kinetische Untersuchung der NO-Reduktion durch  $\text{Fe}^{2+}$ /Ascorbat bestätigt die lineare Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom NO Partialdruck (Abb. 24). Nachdem die NO Startkonzentration nach 13 min Reaktionszeit auf etwa die Hälfte abgefallen war, hatte sich die Umsatzrate ebenfalls um den Faktor 2 verringert.  $\text{N}_2$  ist nicht am Reaktionsgeschehen beteiligt. Die vorgelegte Konzentration von 0.3% in der Gasphase blieb während der Dauer des Experimentes konstant. Im Gegensatz zu allen übrigen Untersuchungen wurde hier nur die Konzentration der Gaskomponenten in der Gasphase bestimmt und nicht deren Gesamtmenge im Testansatz. Die für  $\text{N}_2\text{O}$  ermittelten

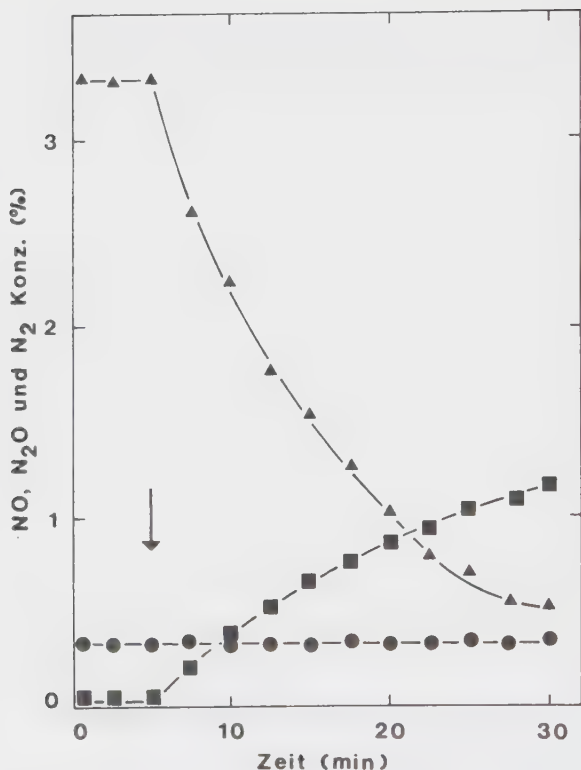


Abb. 24 Kinetik der NO-Reduktion durch Fe/Ascorbat

Eine 100 ml Serumflasche, die 25 ml 0.1 M Tris/HCl puffer, pH 7.5, und 2 mmol Ascorbat enthielt wurde gasdicht verschlossen und mit Helium gefüllt. Anschließend wurden 250  $\mu$ l N<sub>2</sub> und 2.5 ml NO injiziert (Start der Reaktion). Der Testansatz wurde unter starkem Rühren bei 25 °C inkubiert. Nach 5 min erfolgte der Zusatz von 25  $\mu$ mol FeSO<sub>4</sub> (Pfeil). Für die Bestimmung der NO  $\blacktriangle$ , N<sub>2</sub>O  $\blacksquare$  und N<sub>2</sub>  $\bullet$  Konzentration in der Gasphase wurde in Abständen von 2.5 min je 100  $\mu$ l Gasprobe entnommen.

Werte liegen um fast 20 % niedriger als es auf Grund der Stöchiometrie dieser Reaktion zu erwarten wäre (vergl. Tab. 11). Diese Verringerung ist auf die verglichen mit NO etwa 13 fach höhere Löslichkeit von  $N_2O$  in wässrigen Systemen zurückzuführen (Normalliter Gas bei 1 bar Partialdruck und 20 °C in 1 kg  $H_2O$ ).

### 3.5.2. KOPPLUNG DER NICHT ENZYMATISCHEN, Fe/ASCORBAT ABHÄNGIGEN NO-REDUKTION AN EINEN ENZYMATISCHEN NO GENERATOR

Cytochrom cd aus Pseudomonas perfectomarinus (Zumft und Vega, 1979) katalysiert in Gegenwart von Ascorbat und PMS die Reduktion von Nitrit. Das Produkt der Nitritreduktion ist ein Gasgemisch aus NO und  $N_2O$ , wobei mit zunehmendem Reinheitsgrad des Enzymes der Anteil des  $N_2O$  im Produktgemisch von etwa 25 % in den 235 800·g Zentrifugationsüberständen auf weniger als 10 % beim homogenen Protein absinkt. Da an cd-Cytochromen aus anderen denitrierenden Organismen über ähnliche Beobachtungen berichtet wurde (Matsubara und Iwasaki, 1971; Wharton und Weintraub, 1980) lag die Vermutung nahe, daß die mit steigendem Reinheitsgrad abnehmende  $N_2O$  Bildung eine Folge der Anreicherungsprozedur sein könnte. Bei Versuchen, diese Annahme zu überprüfen stellte sich heraus, daß der Zusatz selbst geringster  $Fe^{2+}$  Mengen zu Testansätzen, die Cytochrom cd, Nitrit, Ascorbat und PMS enthielten die  $N_2O$  Produktion drastisch steigerte, während das anfangs gebildete NO sich auf einen niedrigeren Niveau einstellte (Abb. 25). Wurden  $Fe(II)$ -Salz und Cytochrom cd zusammen und gleichzeitig in Reaktionsmischungen gegeben, konnte simultane Entstehung von NO und  $N_2O$  gemessen werden, wobei letzteres mit einer geringen lag Phase entstand (Abb. 26). Der Gesamtelektronenfluß in diesem System erfolgte in beträchtlich höherem Umfang zum  $N_2O$  als zum NO (Abb. 26).

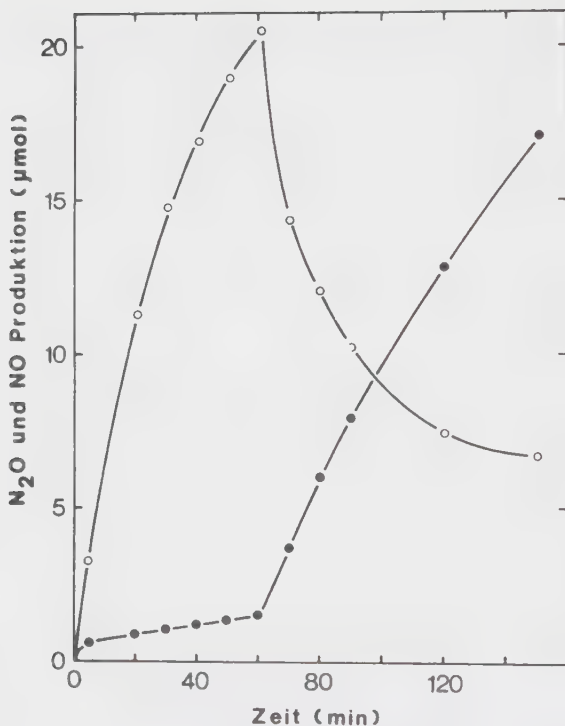


Abb. 25 Nitritreduktion in Gegenwart von Cytochrom cd und Fe(II)

Der Testansatz enthielt in 3 ml 133 mM Tris/HCl Puffer, pH 7.5, 100 µmol Na-Ascorbat, 0.5 µmol Phenazinmethosulfat (PMS) und 140 µg gereinigtes Cytochrom cd aus *Pseudomonas perfectomarinus*. Die Reaktion wurde durch Zufügen von 40 µmol NaNO<sub>2</sub> gestartet. Nach 60 min wurden 3 µmol FeSO<sub>4</sub> addiert. NO, (○); N<sub>2</sub>O, (●).

Wurde anstelle des aktiven Proteins hitzedenaturiertes Cytochrom cd eingesetzt, so unterblieb jegliche Gasproduktion aus Nitrit. N<sub>2</sub>O entstand jedoch auch dann, wenn dem Testansatz, der denaturiertes Cytochrom cd enthielt, NO als Substrat beigegeben wurde.

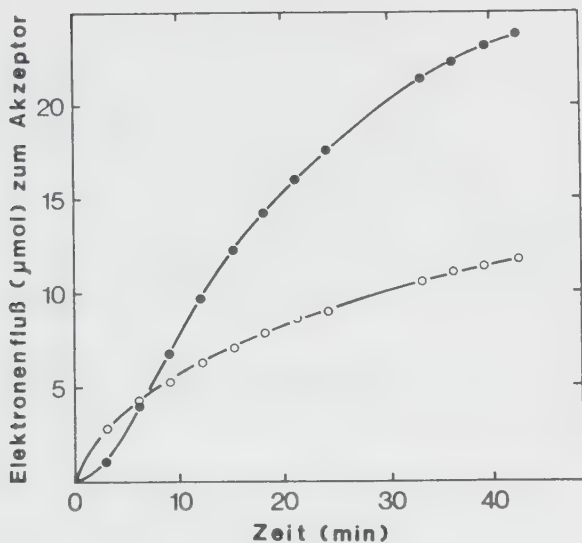


Abb. 26  $\text{N}_2\text{O}$  als scheinbares Produkt der Nitritreduktion durch Cytochrom cd

Der Testansatz enthielt in einem Volumen von 3 ml 300  $\mu\text{mol}$  Tris/HCl, pH 7.5, 3  $\mu\text{mol}$   $\text{FeSO}_4$ , 100  $\mu\text{mol}$  Na-Ascorbat, 0.5  $\mu\text{mol}$  Phenazinmethosulfat (PMS) und 300  $\mu\text{g}$  gereinigtes Cytochrom cd aus Pseudomonas perfectomarinus. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 50  $\mu\text{mol}$   $\text{NaNO}_2$  gestartet. Symbole: NO (○);  $\text{N}_2\text{O}$  (●).

### 3.5.3. EIGENSCHAFTEN DER MEMBRANGEBUNDENEN NO-REDUKTASEAKTIVITÄT

Versuche, Ascorbat und Phenazinmethosulfat bzw. NADH und FMN durch andere Elektronendonoren zu ersetzen, die ausreichend hohe Aktivität der membrangebundenen NO-Reduktase gewährleisten würden, ohne gleichzeitig eine nicht enzymatische NO-Reduktion zu verursachen, schlugen fehl. Ähnliche Bemühungen einer anderen Gruppe, die an zellfreien, NO reduzierenden Systemen aus Alcaligenes arbeitete, führten ebenfalls nicht zur Auffindung von geeigneteren Donoren (Miyata et al., 1969; Matsubara und Iwasaki, 1971).

Die  $K_m$ -Werte für Phenazinmethosulfat und Ascorbat betragen  $2 \mu\text{M}$  bzw.  $120 \mu\text{M}$  bezogen auf die enzymatische NO-Reduktion.

Das pH Optimum für die NO-Reduktion durch Membranvesikel liegt mit pH 5.2 im gleichen, leicht sauren Bereich wie das für Partikelfractionen aus Alcaligenes faecalis (Matsubara und Iwasaki, 1972). Zum Neutralpunkt hin fällt die Aktivität steil ab und steigt ab etwa pH 7.8 erneut (Abb. 20). Wahrscheinlich handelt es sich hier um Überlagerung von enzymatischer und nicht enzymatischer NO-Reduktion.

#### 3.5.3.1. MEMBRANGEBUNDENE NO-REDUKTASEAKTIVITÄT ALS FUNKTION DES NO PARTIALDRUCKES

Der Einfluß des NO Partialdruckes auf die membrangebundene NO-Reduktase wurde im Bereich zwischen 11 und 222 mbar untersucht (Abb. 27). Bei geringer Membrankonzentration zeigte die Reaktion ab etwa 50 mbar NO Sättigungscharakter, während in den beiden Testreihen mit höherer Membrandichte deutliche Maxima bei 0.1 bar zu erkennen waren. Das Aktivitätsoptimum von NO reduzierenden Partikelfractionen aus Alcaligenes sp. wurde mit 10 % NO in der Gasphase erzielt (Miyata et al., 1969).

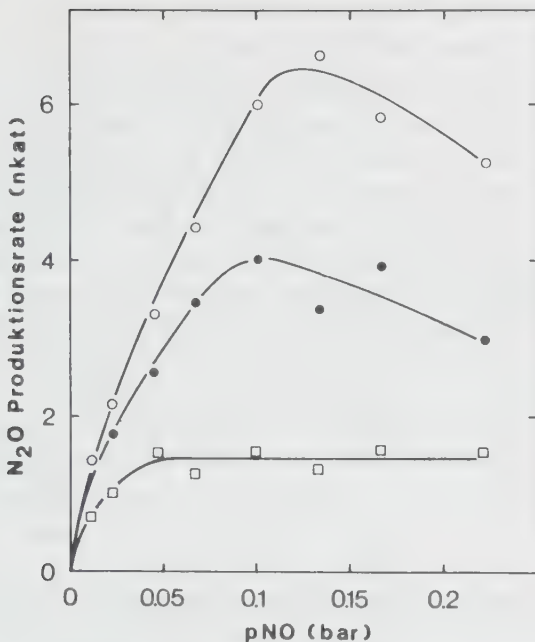


Abb. 27 Abhängigkeit der NO-Reduktionsgeschwindigkeit vom NO Partialdruck und von der Membrankonzentration

Standardbedingungen mit 67 mM Acetatspuffer pH 5.5. Die Proteinkonzentration in den Reaktionsansätzen betrug 0,8 mg/ml □ ; 2,1 mg/ml ● und 4,2 mg/ml ● .

### 3.5.3.2. WIRKUNG VON METALLKOMPLEXBILDNERN

Die Liganden, die in 10 fach höherer molarer Konzentration als  $\text{Fe}^{2+}$  die Fe/Ascorbat abhängige NO-Reduktion vollständig oder zum überwiegenden Teil hemmten, wurden auch hinsichtlich ihrer Wirkung auf die membrangebundene NO-Reduktaseaktivität getestet. Weder EDTA noch Cystein, die das Fe/Ascorbatsystem zu 100 % bzw. zu 85 % inaktivierten zeigten irgendeinen Einfluß auf die physiologische Reduktion. Diethyldithiocarbaminat und Citrat hemmten in 10 mM Konzentration um etwa 80%.

### 3.5.4. TRENNUNG DER FE/ASCORBAT ABHÄNGIGEN VON DER PHYSIOLOGISCHEN NO-REDUKTION

Durch Nutzung der spezifischen Eigenschaften bei-  
der Reaktionen gelang es die physiologische NO-Reduktase-  
aktivität frei von Überlagerungen durch die Fe/Ascorbat  
abhängige Reaktion zu erfassen. Wurden die Testansätze mit  
10 mM EDTA versetzt so konnte die nicht enzymatische Reak-  
tion selbst bei pH 7.1 und in Gegenwart von 1 mM  $\text{FeSO}_4$  voll-  
ständig eliminiert werden. Etwa 20 % der apparenten Gesamt-  
aktivität von Membranfraktionen aus Pseudomonas perfectoma-  
rinus ist unter diesen Bedingungen nicht physiologischen  
Ursprunges (Tab.13). Die Verwendung von EDTA und/oder die  
Ausführung der enzymatischen NO-Reduktasetests bei pH 5.2  
erlaubt die störungsfreie Messung der physiologischen NO-  
Reduktion.

Tabelle 13

Eliminierung der nicht enzymatischen Anteile der apparen-  
ten NO-Reduktion durch Membranfraktionen mittels EDTA

| Komponenten                           | $\text{N}_2\text{O}$ Prod.<br>(%) |
|---------------------------------------|-----------------------------------|
| Asc. + PMS                            | 0 - 1                             |
| Asc. + PMS + Fe                       | 168                               |
| Asc. + PMS + Fe + EDTA                | 0 - 2                             |
| Membranen + Asc. + PMS                | 100                               |
| Membranen + Asc. + PMS + EDTA         | 79                                |
| Dialysierte Memb. + Asc. + PMS        | 77                                |
| Dialysierte Memb. + Asc. + PMS + EDTA | 75                                |
| Membranen + Asc. + PMS + Fe           | 237                               |
| Membranen + Asc. + PMS + Fe + EDTA    | 82                                |

Bedingungen: 133 mM Tris/HCl, pH 7.1; 1 mM  $\text{FeSO}_4$ ; 10 mM  
 $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ; 5 mg Membranprotein; 0.17 mM Phenazinmethosul-  
fat (PMS); 33.3 mM Ascorbat (Asc.); 110 mbar NO. Ein  
Teil der Membranen wurde 24 h bei 4 °C gegen 133 mM Tris/  
HCl, pH 7.1 dialysiert.

### 3.5.5. ANREICHERUNG DER DISSIMILATORISCHEN NO-REDUKTASE AUS PSEUDOMONAS PERFECTOMARINUS

Aus zellfreien Rohextrakten von Pseudomonas perfectomarinus wurde die NO-Reduktase durch fraktionierte Zentrifugation um den Faktor 5.3 angereichert (Tab. 14). Die Aktivitätsmessungen erfolgten bei pH 5.5, um die nicht enzymatische Fe/Ascorbat abhängige Reduktion zu unterdrücken. Das Maximum der spezifischen Aktivität befand sich im Sediment der 235 800 · g Ultrazentrifugation. Der hochtourige Überstand zeigte nur Spuren an NO-Reduktaseaktivität. Nach diesem letzten Zentrifugationsschritt wurde ein sprunghafter Anstieg der Gesamtaktivität festgestellt. Vorläufige Untersuchungen lassen vermuten, daß der zellfreie Rohextrakt von Pseudomonas perfectomarinus eine Substanz enthält, die die membrangebundene NO-Reduktase hemmt. Über eine ähnliche Beobachtung an partikelgebundener NO-Reduktase aus Alcaligenes faecalis berichteten Matsubara und Iwasaki (1971). Eigenschaften und Funktion dieses Hemmstoffes sind bisher nicht bekannt.

Tabelle 14

Verteilung der enzymatischen NO-Reduktion in Pseudomonas perfectomarinus

Bedingungen: Standardansatz, aber hier mit 133 mM Acetatspuffer, pH 5.5; keine  $\text{FeSO}_4$  Zugabe.

| Fraktion   |             | Protein<br>(mg) | Akt.<br>(nkat) | Spez. Akt.<br>(nkat/mg) | Ausbeute<br>(%) |
|------------|-------------|-----------------|----------------|-------------------------|-----------------|
| Rohextrakt |             | 1415            | 453            | 0.32                    | 100             |
| Pellet     | 29 000 · g  | 108             | 86             | 0.79                    | 19              |
| Überstand  | 29 000 · g  | 1302            | 508            | 0.39                    | 112             |
| Membranen  | 235 800 · g | 580             | 976            | 1.68                    | 216             |
| Überstand  | 235 800 · g | 721             | 27             | 0.04                    | 6               |

#### 4. DISKUSSION

Es ist bekannt, daß unter aeroben Wachstumsbedingungen keiner, der an der Denitrifikation beteiligten Enzymkomplexe synthetisiert wird (Payne, 1973; Delwiche und Bryan, 1976). So wiesen auch Zellproben aus aeroben Kulturen von Pseudomonas perfectomarinus weder Nitrit- noch NO- noch  $N_2O$ -Reduktaseaktivität auf (Tab. 3).

Unter reduziertem  $O_2$  Partialdruck und in Gegenwart von Nitrat angezogene Zellen besaßen alle drei Teilaktivitäten, wenn auch mit deutlicher Abstufung. So wurde die Synthese der  $N_2O$ -Reduktase nicht, die der Nitritreduktase partiell und die der NO-Reduktase zum überwiegenden Teil unterdrückt (Tab. 3).

Für die Expression der Nitrit- und NO-Reduktase ist zu entnehmen, daß die  $O_2$  Repression über die Induktion durch Nitrit, bzw. dessen Dissimilationsprodukte dominiert, wenn beide terminalen Elektronenakzeptoren gleichzeitig unter semiaeroben Bedingungen zur Verfügung standen. Unter anaeroben Bedingungen hingegen scheint die Induktion durch

Nitrat (oder dessen Reduktionsprodukte) erforderlich zu sein, denn Zellen, die anaerob unter  $N_2O$  angezogen wurden entwickelten nur geringe Nitrit- und NO-Reduktaseaktivität. Diese Beobachtung ließe sich zumindestens theoretisch auch durch  $N_2O$  Repression erklären. Der reprimierende Einfluß von  $O_2$  auf den NO-Reduktasekomplex geht auch aus Abb. 8 hervor. In den semiaeroben Begasungsphasen war stets ein Absinken der spezifischen NO-Reduktaseaktivität festzustellen.

Ein weiterer Unterschied in der Expression beider Systeme ist ihr sequentielles Erscheinen in semiaerob wachsenden Kulturen. Nitritreduktaseaktivität konnte stets zu einem früheren Zeitpunkt als NO-Reduktion gemessen werden. Erst in der stationären Phase bestand kein Unterschied mehr zwischen den spezifischen Aktivitäten beider Enzyme. Dies könnte entweder auf sequentielle Induktion durch verschiedene Dissimilationsprodukte des Nitrates zurückgeführt werden, oder auf höhere  $O_2$  Sensitivität der Synthese der NO-Reduktase, da bei konstanter  $O_2$  Zufuhr der  $O_2$  Partialdruck mit zunehmender Zelldichte in semiaeroben Kulturen absinkt.

Semiaerobe Nitratzellen besitzen etwa gleich hohe spezifische  $N_2O$ -Reduktaseaktivität wie anaerob gezogene Nitratzellen. In beiden Zelltypen wurde jedoch signifikant höhere  $N_2O$ -Reduktaseaktivität gemessen als in  $N_2O$ -Zellen. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen, die besagen, daß die Initiierung der Synthese durch Nitrat für keines der Denitrifikationsenzyme einen Vorteil bedeute (Payne, 1973). Übereinstimmend mit den Resultaten von Payne geht aus den in Tabelle 3 dargestellten Daten hervor, daß der entscheidende Kontrollfaktor für die Expression der  $N_2O$ -Reduktase der vorliegende  $O_2$  Partialdruck ist. Die Synthese bedarf nicht der Induktion durch  $N_2O$  oder durch einen der anderen stickstoffhaltigen Elektronenakzeptoren.

Umfangreiche Daten liegen über die Expressionsbedingungen der Denitrifikationsenzyme in einem Stamm der Gattung Alcaligenes vor (Matsubara, 1971). Obwohl dort ebenso wie für Pseudomonas perfectomarinus dem  $O_2$  Partialdruck eine entscheidende regulatorische Funktion bei der Synthese der  $N_2O$ -Reduktase zugesprochen wurde, konnte der Autor die Induktion durch Nitrat, das in etwa  $1 \mu M$  Konzentration in dem verwendeten Komplexmedium enthalten war nicht ausschließen. In dem für Pseudomonas perfectomarinus verwendeten synthetischen Asparaginmedium konnte auch in der 10-fach konzentrierten Stammlösung kein Nitrat nachgewiesen werden.

Durch Anwendung der Erkenntnisse über die Expressionsbedingungen des Denitrifikationssystems in Pseudomonas perfectomarinus gelang es unter Einbeziehung des Parameters "Cu Gehalt des Mediums" Zellen mit 6 der 8 möglichen Kombinationen an Teilaktivitäten zu produzieren (Tab. 15).

Es ist bekannt, daß  $O_2$  nicht nur auf der Ebene der Enzymbiosynthese sondern auch als Inhibitor der Aktivitäten sämtlicher denitrifizierender Reduktasen eine regulatorische Funktion besitzt (Payne, 1973; Bryan, 1981). Über die molekularen Grundlagen dieser Hemmung liegen nur wenige Untersuchungen vor. Die in einigen älteren Arbeiten beschriebene sog. aerobe Denitrifikation konnte in allen bisher überprüften Fällen auf verminderten  $O_2$  Partialdruck in dichten Zellsuspensionen zurückgeführt werden (Bryan, 1981). De Groot und Stouthamer (1970) kamen zu dem Schluß, daß die durch  $O_2$  oxidierte Nitratreduktase nicht mehr in der Lage sei, Elektronen aufzunehmen und diese daher über eine andere Oxidoreduktase auf  $O_2$  übertragen würden. Durch die Beobachtung, daß Mutanten von Pseudomonas aeruginosa, die nicht mehr zur aeroben Atmung befähigt waren auch unter normalem  $O_2$  Partialdruck Nitrat respirierten, folgerten van Hartingsveldt und Stouthamer (1974),

Anzucht von Pseudomonaden mit unterschiedlicher Expression der Teilaktivitäten der Denitrifikation

| Anzuchtbedingungen (1) |                                                                    | Verteilung der Teilaktivitäten (2) |      |                    |                  |  |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------|------|--------------------|------------------|--|
| anaerob                | +NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>                                      | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>       | → NO | → N <sub>2</sub> O | → N <sub>2</sub> |  |
| anaerob                | +NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Cu <sup>2+</sup>                    | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>       | → NO | → N <sub>2</sub> O | → N <sub>2</sub> |  |
| anaerob                | +N <sub>2</sub> O                                                  | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>       | → NO | → N <sub>2</sub> O | → N <sub>2</sub> |  |
| semiaerob              | +NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Cu <sup>2+</sup> log <sup>(3)</sup> | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>       | → NO | → N <sub>2</sub> O | → N <sub>2</sub> |  |
| semiaerob              |                                                                    | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>       | → NO | → N <sub>2</sub> O | → N <sub>2</sub> |  |
| semiaerob              | +NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> log <sup>(3)</sup>                   | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>       | → NO | → N <sub>2</sub> O | → N <sub>2</sub> |  |
| aerob                  |                                                                    | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>       | → NO | → N <sub>2</sub> O | → N <sub>2</sub> |  |

(1) Zur Anzucht wurde synthetisches Asparagin/Citrat Medium verwendet

(2) Dick ausgezogene Pfeile stehen für Aktivitäten, die unter optimalen Bedingungen für das jeweilige Enzym erhalten werden können. Dünne Pfeile stehen für stark reduzierte Aktivitäten von 0 - 30 % der Optimalwerte.

(3) Die Zellernte erfolgte während der späten logarithmischen Phase des Kulturwachstums.

daß auch in Wildtypzellen nicht die Präsenz von  $O_2$  Molekülen die primäre Ursache für die Hemmung der Denitrifikation sei, sondern vielmehr deren Eigenschaft als Elektronenakzeptor. An Paracoccus denitrificans und Escherichia coli wurde die reversible Hemmung der Nitrat- und Nitrit-Aufnahme durch  $O_2$  mit Elektroden verfolgt (John, 1977). Die Umschaltung des Elektronenflusses von  $N_2O$  auf  $O_2$ , die durch den vorliegenden  $O_2$  Partialdruck kontrolliert wird konnte für Pseudomonas perfectomarinus quantitativ erfaßt werden (Abb. 12). Der Vorgang erwies sich als reversibel beim Absinken des  $O_2$  Partialdruckes unter 10 mbar. Da die hierfür eingesetzten Zellen vor Beginn der Messungen nur für wenige min bei  $0^\circ C$  mit Luftsauerstoff in Kontakt kamen, dürfte das Ergebnis als Bestätigung des konstitutiven Charakters der aeroben Atmungsenzyme gewertet werden.

Die Diauxie des Wachstums von Pseudomonas stutzeri in nitrathaltigem Komplexmedium wurde als Funktion der Nitratstartkonzentration dargestellt (Kodama et al., 1969). Die Autoren postulierten die Wechselwirkung von Nitrat mit der Nitritreduktase auf zwei Ebenen: Nitrat reprimiere die Synthese der Nitritreduktase und stehe gleichzeitig in direkter Konkurrenz mit Nitrit als terminalem Elektronenakzeptor. In den hier an Pseudomonas perfectomarinus durchgeführten Untersuchungen wurde bei konstanter Nitratstartkonzentration ein ähnlicher biphasischer Wachstumsverlauf beobachtet. Die Dauer der intermediären lag Phase wurde als Funktion der aktuellen Zelldichte zum Zeitpunkt der maximalen Nitritkonzentration im Medium erkannt. (Abb. 9). Diese Abhängigkeit läßt sich nicht durch Repressionswirkung des Nitrates oder durch kompetitive Elektronenaufnahme der beiden Akzeptoren erklären.

Eine Möglichkeit der Interpretation des biphasischen Wachstums wäre durch das Auftreten von Faktoren gegeben, die die weitere Zellteilung hemmen und erst elimi-

niert werden müßten, bevor weitere Zellteilung erfolgen könnte.

Kontamination der Kulturen durch Luftsauerstoff, der als Hemmfaktor der Nitritreduktion denkbar wäre und zunächst veratmet werden müßte kann als Ursache ausgeschlossen werden, da die Diauxie auch in Anzuchten, die unter Schutzgasatmosphäre vorgenommen wurden zu beobachten war. Eine andere, näherliegende Interpretationsmöglichkeit ist die Annahme der Produktion eines Inhibitors während der ersten logarithmischen Wachstumsphase oder während der beginnenden Nitritreduktion, der metabolisiert werden müßte, um der Kultur den Übergang in die zweite logarithmische Wachstumsphase zu ermöglichen. Wenn in Betracht gezogen wird, daß die Induktion der Nitrit- und NO-Reduktase sequentiell erfolgt und deshalb mit beginnender Nitritreduktion, zu Beginn der intermediären lag Phase ein NO Pool entstehen würde, dann könnte als Konsequenz eine Inaktivierung der Nitritreduktase durch frei werdendes NO eintreten. Für die  $N_2O$ -Reduktase wurde gezeigt, daß sie in Zellen mit schwacher NO-Reduktase durch geringe NO Konzentrationen von wenigen  $\mu M$  vollständig gehemmt wird. Diese Hemmung erwies sich in Zellen mit schwacher NO-Reduktase als unspezifisch und von der Zelldichte abhängig. Da NO als Nitrosylligand an Hämgruppen bindet, könnte der zur Nitritreduktion erforderliche Elektronentransport durch NO blockiert werden, solange die Zellen nicht über eine starke NO-Reduktase verfügen. Die beginnende Nitritreduktion würde in diesem Fall durch eine Art von Feedbackhemmung unterbrochen werden, bis nach erfolgter Induktion der NO-Reduktase das intermediär akkumulierte NO reduziert würde. In Zellsuspensionen mit geringer Dichte wäre hierfür ein längerer Zeitraum erforderlich als in dichten Kulturen.

Es wird zu klären sein, ob dieses, aus Ergebnissen der vorliegenden Arbeit theoretisch abgeleitete Modell einer Feedbackhemmung der Nitritreduktase in Zellen mit

schwacher NO-Reduktase experimentell bestätigt werden kann. Ein derartiger Mechanismus würde einen wirksamen Schutz der Zelle vor Selbstintoxikation durch das reaktive Radikal NO darstellen, denn es konnte gezeigt werden, daß auch ein denitrifizierender Organismus durch NO, ein Produkt seiner anaeroben Atmung, irreversibel geschädigt wird (Abb. 15).

Die in einigen älteren Arbeiten aufgeführten, indirekten Hinweise über die Hemmung der  $N_2O$ -Reduktion durch NO wurden hier durch direkte Messung an Pseudomonas perfectomarinus bestätigt (Abb. 10). Es wurde gezeigt, daß NO in Zellen mit schwacher NO-Reduktase schon bei einer Konzentration von  $10\ \mu M$  in Lösung die  $N_2O$ -Reduktase vollständig hemmt (berechnet aus Tab. 6). Zellen mit starker NO-Reduktaseaktivität (anaerobe Nitratzellen) und Zellen mit schwacher NO-Reduktaseaktivität ( $N_2O$ -Zellen) verhalten sich unterschiedlich. Mit Hilfe zweier voneinander unabhängiger Methoden wurde nachgewiesen, daß die Inaktivierung der  $N_2O$ -Reduktase in  $N_2O$ -Zellen irreversibel und in anaeroben Nitratzellen reversibler Natur ist. Beide Zelltypen unterscheiden sich in ihrer Sensitivität gegenüber NO etwa um den Faktor 15 (Tab. 4). Über die Ursachen der unterschiedlichen Wirkung von NO auf beide Zelltypen können nur vorläufige Aussagen gemacht werden. Es erwies sich als nicht möglich, in Experimenten, die die direkte quantitative Messung der Umsatzraten erforderten, die Flüsse zwischen NO-,  $N_2O$ - und  $N_2$ -Pool in Zellen mit starker NO-Reduktase eindeutig zuzuordnen. Die Konzentration des Hemmstoffes (NO) und Substrates ( $N_2O$ ) lagen hier in der gleichen Größenordnung und die NO Konzentration konnte während der Dauer der Messreihen, bedingt durch die aktive NO-Reduktase, nicht konstant gehalten werden. Ein Weg zur Umgehung dieser Schwierigkeiten wäre die Verwendung von radioaktiv markiertem  $^{13}NO$  oder  $^{13}N_2O$ . Einige Resultate über das Verhalten von anaeroben Nitratzellen basieren deshalb auf der indirekten Methode, der

Verfolgung der Änderungen der Oxidationsniveaus von Zellcytochromen als Reaktion auf die Einwirkung von NO. Der Mechanismus der Hemmung ist in beiden Zelltypen nicht kompetitiv (Tab. 5, Abb. 16 und 17). Zusammen mit den Feststellungen, daß  $N_2O$ -Zellen irreversibel inaktiviert werden und daß zudem das Ausmaß der Hemmung in diesem Zelltyp von der Proteinmenge im Testansatz abhängt (Tab. 6), kann für  $N_2O$ -Zellen gefolgert werden, daß kein durch Michaelis-Menten Kinetiken darstellbarer Hemmechanismus vorliegt, sondern eine kovalente Wechselwirkung mit NO eintritt. Für anaerobe Nitratzellen ist die Zuordnung zu einem bestimmten Mechanismus aus den oben genannten Gründen bisher nicht möglich.

In Zellen mit schwacher NO-Reduktase wird nicht die Rereduktion der Cytochrome durch Elektronenfluß vom Lactat, sondern deren Oxidation durch  $N_2O$  blockiert. Die Elektronenübertragung von den durch NO im reduzierten Zustand fixierten Cytochromen auf  $O_2$  wird jedoch nicht unterbrochen, obwohl die  $O_2$  Reduktion durch NO ebenfalls erheblich verlangsamt wird. Der Ort der Wechselwirkung von NO mit der  $N_2O$ -Reduktion kann nicht im Bereich der Lactat-oxidation liegen sondern mit hoher Wahrscheinlichkeit am Ende der Elektronentransportkette nahe der  $N_2O$ -Reduktase.

Auf Grund des hier dargestellten Einflusses des NO auf die  $N_2O$ -Reduktion und der Kenntnis von Induktions- und Repressionsbedingungen der Denitrifikationsenzyme ist zu verstehen, daß semiaerob angezogene Zellen verschiedener Pseudomonaden die dissimilatorische Nitritreduktion auf der Stufe des NO oder  $N_2O$  abbrechen und beide Gase in variablem Mischungsverhältnis an die Umgebung ausstoßen. Unter semiaeroben Wachstumsbedingungen besitzen die Zellen nur geringe NO-Reduktaseaktivität und das aus der Nitritreduktion akkumulierte NO hemmt die  $N_2O$ -Reduktion.

Die Emission von NO aus denitrifizierenden Zellkulturen wurde nur vereinzelt beschrieben. In den entsprechenden Untersuchungen wurden unvollständige Denitrifizierer, wie Corynebacterium nephridii, das keine  $N_2O$ -Reduktase besitzt, verwendet (Renner und Becker, 1970). NO wurde außerdem als Produkt der Denitrifikation in sauren Böden identifiziert (Wijler und Delwiche, 1954). Semiaerobe Bedingungen, die sich ungünstig auf die Expression der NO-Reduktase auswirken und daher NO Emission zur Folge haben könnten, dürften vor allem in den oberen Schichten trockener Böden anzutreffen sein (Rolston, 1981). Die Tatsache, daß praktisch keine Daten über NO Produktion durch denitrifizierende Bodenbakterien vorliegen ist auf die hohe Reaktivität dieses Gases zurückzuführen, das mit Luftsauerstoff sehr rasch  $NO_2$  bildet.  $NO_2$  disproportioniert mit Wasser zu Salpetersäure und salpetriger Säure.

NO tritt als Reaktionsprodukt der zwei bisher bekannten Nitritreduktasen auf (Yamanaka und Okunuki, 1963; Iwasaki und Matsubara, 1971; Iwasaki und Matsubara, 1972; Sawhney und Nicholas, 1978; Le Gall et al., 1979; Kakutani et al., 1981; Sawada et al., 1978; Miyata und Mori, 1969). Über die Funktion des NO als Zwischenprodukt der dissimilatorischen Nitritreduktion besteht noch kein einheitliches Bild, da die an verschiedenen Organismen gewonnenen Erkenntnisse zueinander in Widerspruch stehen (Knowles, 1982).

Obwohl eine begrenzte Anzahl von Untersuchungen an in vitro Systemen vorgenommen wurde, die sich mit den Eigenschaften der dissimilatorischen NO-Reduktion befassten, gelang es bisher nicht eine NO-Reduktase zu isolieren und auf molekularer Basis zu charakterisieren. Bei den meisten der bisher beschriebenen Systeme handelt es sich um membrangebundene, Ascorbat und PMS abhängige Komplexe. Sie wurden aus Pseudomonas perfectomarinus (Zumft und Vega, 1979), aus Alcaligenes sp. (Miyata et al., 1969; Miyata,

1971) und aus Alcaligenes faecalis (Matsubara und Iwasaki, 1971) als Präzipitate verschiedener Zentrifugationsprozesse gewonnen.

Zwischen der Partikelfraktion aus Alcaligenes faecalis und Cytochrom cd aus demselben Organismus konnten Matsubara und Iwasaki (1971) signifikante Unterschiede in Bezug auf die NO reduzierenden Eigenschaften beider Komplexe aufzeigen. Auch von anderen Autoren wurde dem Cytochrom cd die Eigenschaft einer NO-Reduktase zugesprochen (Sawhney und Nicholas, 1978; Wharton und Weintraub, 1980). Aus dem löslichen Zentrifugationsüberstand von Pseudomonas perfectomarinus wurde eine Fraktion gewonnen, die mit Hilfe eines komplexen Elektronendonorsystems den Angaben der Autoren zufolge NO zu  $N_2O$  zu reduzieren vermochte (Cox et al., 1971; Cox und Payne, 1973).

Frühere Versuche NO-Reduktasen zu charakterisieren, konzentrierten sich auf Pseudomonas aeruginosa (Chung und Najjar, 1956) und auf Pseudomonas stutzeri (Fewson und Nicholas, 1960). Während Chung und Najjar ein eisen- und kupferabhängiges System vermuteten, das NO zu  $N_2O$  reduzieren sollte, schrieben Fewson und Nicholas einem eisenhaltigen Flavoprotein die Reduktaseeigenschaften zu. Aktivitätsmessungen konnten beide Gruppen zur damaligen Zeit nur mittels manometrischer Methoden durchführen, die zumindest in einem anderen Fall zu qualitativen Fehlinterpretationen geführt hatten (als Ref. siehe: Matsubara, 1970).

Eine unerwartete Komplikation für unsere Untersuchungen an der membrangebundenen NO Reduktase aus Pseudomonas perfectomarinus bedeutete zunächst die Entdeckung der durch  $Fe^{2+}$  katalysierten Reduktion von NO zu  $N_2O$  durch Ascorbat (Zumft und Frunzke, 1982). In vielen Arbeiten über dissimilatorische Nitrit- und NO-Reduktion hatten sich Ascorbat und PMS als das leistungsfähigste und ein einfach zu handhabendes Elektronendonorsystem erwiesen. Als Produkte der Nitritreduktion wurden NO neben unter-

schiedlichen Mengen an  $N_2O$  ermittelt. Da aus diesen Arbeiten keine Hinweise über die Art der durchgeführten Kontrollen zu entnehmen sind und im Fall der Nitritreduktion die Standardmethoden der Hitzedenaturierung oder das Weglassen der katalytischen Komponente aus den Testansätzen versagen (siehe Abb. 26 und 27), kann nicht beurteilt werden, in welchem Ausmaß die  $N_2O$  Produktion auf enzymatische oder Fe/Ascorbat abhängige NO-Reduktion zurückzuführen ist. Bereits geringe  $Fe^{2+}$  Konzentrationen von  $5 \mu M$  katalysieren in Gegenwart von Ascorbat signifikante NO-Reduktion zu  $N_2O$  (Abb. 22). Derartige Konzentrationen dürften in allen biologischen Rohfraktionen um ein Vielfaches überschritten werden. Die stöchiometrischen Messungen und die Daten aus Tabelle 8 belegen, daß die zur Reduktion benötigten Elektronen weder aus den  $Fe^{2+}$  Kationen allein zur Verfügung gestellt werden, noch daß Ascorbat ohne  $Fe^{2+}$  imstande wäre als Elektronendonator zu fungieren. Zur Ausbildung der N-N Bindung bei der Entstehung von  $N_2O$  ist die Anwesenheit beider Komponenten erforderlich.

Der Entstehung der N-N Bindung wird für das Verständnis des chemischen Mechanismus der Denitrifikation zentrale Bedeutung zugemessen (Averill und Tiedje, 1982). Unser Interesse am Fe/Ascorbatsystem galt deshalb nicht allein dessen Eigenschaft als unerwünschter Nebenreaktion der physiologischen NO-Reduktion sondern vor allem dessen Charakter eines Modellsystems zur katalytischen Ausbildung der N-N Bindung.

Die Reaktionsgleichung für die Reduktion von NO zu  $N_2O$  lautet:



$$E_o = 1177 \text{ mV (bei pH 7.0)}$$

$$G_o = - 306 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Bei ausschließlicher Betrachtung dieser Reaktion aus thermodynamischer Sicht sollte jedes Redoxpaar, dessen Poten-

tial negativer als +1177 mV liegt in der Lage sein, NO zu  $N_2O$  zu reduzieren. Tatsächlich tritt diese Reaktion oft nur unter extremen Bedingungen oder in Anwesenheit geeigneter Katalysatoren ein. Reaktionskinetische Größen sind neben der geringen Wasserlöslichkeit von NO die Ursache für dieses Verhalten.

In dem hier beschriebenen Fe/Ascorbat Komplex muß Ascorbat die Funktion eines Elektronendonors einnehmen, wobei es selbst bis zum Dehydroascorbat oxidiert wird (Tab. 12) und auch die eines potentialsenkenden Liganden. Über die Strukturen von Eisen-Ascorbatkomplexen ist bisher wenig bekannt (Visser, 1980). Es wurde vorgeschlagen, daß die O-1 und O-2 Atome des Ascorbates vom Fe-Zentralatom überbrückt werden könnten und daß dann dieser Chelatkomplex als Zentraleinheit eines Hydroxylierungssystems fungiere (Udenfriend System; Udenfriend et al., 1954). Dieses Modell könnte auf Grund der mit seiner Entstehung einhergehenden starken Entropiezunahme sowie der negativen freien Energie ( $\Delta G_0'$ ) erklären, daß in Anwesenheit von Ascorbat selbst bei pH 10 keine Ausfällung von Eisenoxiden bzw. -hydroxiden zu erkennen war. Es ist zu vermuten, daß zwischen unserem und dem Udenfriend System Parallelen gezogen werden können, wenngleich auch die Struktur dieses Hydroxylierungskomplexes, der  $Fe^{2+}$ , Ascorbat und EDTA enthält ebensowenig geklärt ist wie die unseres Systems.

Die spektroskopisch verfolgte Farbänderung der Testansätze von tief violett nach braun (Abb. 23) während der Aufnahme von NO dürfte auf die Entstehung von Eisen-nitrosylkomplexen zurückzuführen sein. Inwieweit Ascorbat als Ligand in die Koordinationssphäre des Eisens integriert ist, konnten wir experimentell nicht feststellen. Versuche, mit Hilfe von 100 MHz Protonenresonanzspektroskopie Veränderungen in der chemischen Abschirmung der Ascorbatwasserstoffe als Folge der Einbeziehung des Ascorbates in die Koordinationssphäre des Eisens festzustellen

len scheiterten. Selbst bei sehr geringen Eisenkonzentrationen machte sich der Paramagnetismus von  $\text{Fe}^{3+}$  durch longitudinale Protonenrelaxationsbeschleunigung in Form von stark verbreiterten Resonanzlinien störend bemerkbar. Eine Interpretation der NMR Spektren war daher nicht möglich. Auch die Komproportionierung von Ascorbat und Dehydroascorbat zu dem ebenfalls paramagnetischen Semidehydroascorbat (Foerster et al., 1965) dürfte zur Resonanzlinienverbreiterung beigetragen haben.

Der Nachweis paramagnetischer Eisenspezies unter Turnoverbedingungen gelang durch die Aufnahme von ESR Spektren. Kontrollspektren, die vor dem Start der Reaktion mit NO aufgenommen wurden ergaben keinen Hinweis auf die Anwesenheit von paramagnetischen  $\text{Fe(III)}$  Komplexen. Theoretisch könnte es sich dabei sowohl um oktaedrisch koordinierte  $\text{Fe}^{2+}$  high spin Komplexe als auch um ebenfalls von einem oktaedrischen Ligandenfeld umgebene  $\text{Fe}^{3+}$  Systeme handeln. Wegen der zu erwartenden starken energetischen Aufspaltung der 3d Niveaus durch Ascorbatliganden erscheint die erste Möglichkeit sehr unwahrscheinlich.

Kürzlich wurde über die Reduktion von NO zu  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2$  und  $\text{NH}_3$  durch ein Fe/Acetat System berichtet (Bonner und Pearsall, 1982; Pearsall und Bonner, 1982). Die Art der Produkte war abhängig vom pH der 2 M Acetatlösung. Ausführlich untersucht wurde der Mechanismus der Reduktion des NO zu  $\text{N}_2\text{O}$ . Im Gegensatz zu unserem System wurden dort die benötigten Elektronen nicht durch Liganden, sondern durch hohe  $\text{Fe}^{2+}$  Konzentrationen eingespeist. Die  $\text{N}_2\text{O}$  Produktion begann im Fe/Acetat System auch erst bei pH Werten über 4. Während in unserem Fe/Ascorbat Komplex den Fe-Ionen echte katalytische Funktion zukommt, sind diese in der von Bonner und Pearsall untersuchten NO-Reduktion als Elektronendonoren stöchiometrisch an der Reaktion beteiligt.

Basierend auf kinetischen Untersuchungen mit  $^{15}\text{N}$  Tracersubstanzen postulierten Bonner und Pearsall die Existenz intermediärer Eisennitrosylkomplexe aus deren Dissoziationsprodukt  $\text{HNO}$  durch Dimerisation  $\text{N}_2\text{O}$  und  $\text{H}_2\text{O}$  entstehen sollen.

Die experimentellen Befunde am Fe/Acetat System und am Fe/Ascorbatsystem stehen im Gegensatz zu einem hypothetischen Modell von Averill und Tiedje (1982). Dort wird die intermediäre Ausbildung eines (Trioxodinitrato)Fe(II)-Komplexes aus einem Eisennitrosylkomplex und Nitrit postuliert, aus dem durch Reduktion über Oxohyponitrit  $\text{N}_2\text{O}$  erzeugt werden soll. Die von beiden Autoren vorgeschlagene Beteiligung von Nitrit bei der Ausbildung der N-N Bindung konnte experimentell weder am Fe/Acetat System noch am Fe/Ascorbat System bestätigt werden.

Neben den noch weiter zu führenden Untersuchungen über strukturelle und mechanistische Eigenschaften des Fe/Ascorbat Systems soll auch überprüft werden, inwieweit es geeignet ist, um NO Kontaminationen aus Gasströmen und Nitrosamine aus Lösungen durch katalytische Reduktion zu entfernen.

Spezifische Unterschiede im Verhalten der membran- gebundenen NO-Reduktase und des Fe/Ascorbat Systemes wurden genutzt, um die enzymatische NO-Reduktion frei von Überlagerungen durch nicht enzymatische Parallelreaktion zu messen. Durch die selektive Hemmwirkung von EDTA auf den Fe/Ascorbat Komplex und durch Ausführung der enzymatischen Tests bei pH Werten um 5.2 wurde die chemische Reduktion ohne Tangierung der physiologischen Aktivität blockiert. Der Anteil an Fe/Ascorbat abhängiger NO-Reduktion betrug etwa 20 % der gemessenen Bruttoaktivität (Tab. 14).

Die dissimilatorische, membrangebundene NO-Reduktase aus Pseudomonas perfectomarinus weist in einigen Punkten Übereinstimmung mit zwei äquivalenten Systemen

aus Alcaligenes sp. (Miyata et al., 1969; Miyata, 1971) und aus Alcaligenes faecalis (Matsubara und Iwasaki, 1971 und 1972) auf.

Wie für Pseudomonas perfectomarinus, so erwiesen sich auch für die beiden Alcaligenes Stämme Ascorbat und PMS als effektivstes Elektronendonorsystem. Die spezifische NO-Reduktaseaktivität von Membranfraktionen lag um den Faktor 3 höher als die der Partikelfractionen aus Alcaligenes faecalis. Frisch präparierte Membranen aus Alcaligenes sp. entwickelten auch mit Lactat eine Aktivität von 1.1 nkat/min. Die Lactat abhängige Aktivität erwies sich jedoch als instabil, benötigte eine lag Phase vor der NO Aufnahme und lag nur bei etwa 30 % der unter gleichen Bedingungen mit Ascorbat/PMS erreichbaren.

Als pH Optima für die membranassoziierten Reduktasekomplexe wurden 5.2 für Pseudomonas perfectomarinus, 5.5 für Alcaligenes faecalis und 7.0 - 7.4 für Alcaligenes sp. bestimmt. Die NO reduzierenden Partikelfractionen bei der Alcaligenes Stämme besitzen deutliche Aktivitätsmaxima bei 100 mbar NO Partialdruck. In Pseudomonas perfectomarinus stellte sich die Aktivität der membrangebundenen NO-Reduktase ebenfalls als Funktion des NO Partialdruckes dar, mit nahezu linearer Abhängigkeit bis zum Maximum bei 100 mbar und signifikantem Rückgang bei noch höheren Partialdrucken. Aus diesen Daten wurde der  $K_m$  für NO in gelöster Form in Bezug auf die enzymatische Reduktion des NO berechnet. Er liegt in guter Übereinstimmung mit bei den Alcaligenes Spezies bei 120  $\mu M$ .

Der Enzymanreicherungsfaktor zwischen zellfreiem Rohextrakt und Membranpellet liegt bei 5.3 für Pseudomonas perfectomarinus und 3.5 für Alcaligenes sp. (Miyata et al., 1969). Die Verdoppelung der Gesamtaktivität, die nach der Ultrazentrifugation zu erkennen war, und die zum überwiegenden Teil wieder verschwand, wenn Rohextrakt oder hoch-

touriger Überstand zu den Membranfraktionen addiert wurden, könnte durch einen inaktivierenden Faktor, der im Ultrazentrifugationsüberstand verbleibt, erklärt werden. Ähnliches wurde von Matsubara und Iwasaki (1971) an Partikelfraktionen aus *Alcaligenes faecalis* beobachtet. Sie konnten diese Substanz durch Ammoniumsulfat Fällung (0-30 %) anreichern. Die Identifizierung und Charakterisierung konnte bisher nicht durchgeführt werden. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich nicht um eine niedermolekulare Verbindung sondern um ein Protein, das im Ausschlußvolumen einer Sephadex G 25 Säule eluiert wird. Da diese Substanz eine wichtige Funktion bei der Regulation der NO-Reduktase einnehmen könnte, wäre die Reinigung und Charakterisierung von größtem Interesse.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

In Pseudomonas perfectomarinus wird die Expression der Denitrifikationsenzyme durch die terminalen Elektronenakzeptoren der aeroben und anaeroben Respiration kontrolliert. Die NO- und die Nitritreduktase werden durch Nitrat induziert und durch  $O_2$  reprimiert. Die Synthese der  $N_2O$ -Reduktase wird durch hohe  $O_2$  Partialdrucke reprimiert. Weder Nitrat noch  $N_2O$  wirken induzierend. Die Expression der Nitritreduktase erfolgt zeitlich vor der der NO-Reduktase.

Die  $N_2O$ -Reduktase wird durch NO gehemmt. Die Intensität und der Mechanismus dieser Hemmung sind von der spezifischen NO-Reduktaseaktivität abhängig. In Zellen mit schwacher NO-Reduktase ist die Hemmung irreversibel und entspricht nicht einer Michaelis-Menten Kinetik. In Zellen mit starker NO-Reduktase ist die Wirkung von NO etwa 15 mal geringer, reversibel und nicht kompetitiv. NO hemmt die Reoxidation der am Elektrohentransport zum  $N_2O$  beteiligten Cytochrome. Die Oxidation des Substrates Lactat wird nicht tangiert.

Als Konsequenz der unvollständigen Expression der NO-Reduktase und der Hemmung der  $N_2O$ -Reduktase durch NO beenden einige Pseudomonaden die Nitritdissimilation auf der Stufe des NO und (oder)  $N_2O$ , obwohl sie hohe spezifische  $N_2O$ -Reduktaseaktivität besitzen.

Eine nicht enzymatische,  $Fe^{2+}$  und Ascorbat abhängige Reduktion des NO zu  $N_2O$  wurde nachgewiesen und charakterisiert. Die Reaktion verläuft 1. Ordnung für NO und wird durch EDTA, 2,2-Dipyridyl und Diethyldithiocarbaminat gehemmt. Im alkalischen Bereich (ab pH 7.5) wird maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht. NO wird quantitativ zu  $N_2O$  reduziert. Andere Produkte treten nicht auf. Der Elektronendonator Ascorbat wird dabei zum Dehydroascorbat oxidiert.

$\text{Fe}^{2+}$  nimmt nur katalytische Funktion ein. Der  $K_m$  beträgt um  $70 \mu\text{M}$ , die molare Aktivität  $0.1/\text{s}$  (bezogen auf die NO Aufnahme). Der Fe/Ascorbatkomplex kann als Modellsystem für die Ausbildung der N-N Bindung dienen.

Die dissimilatorische NO-Reduktase in Pseudomonas perfectomarinus liegt als membrangebundener Komplex vor. Effektivster Elektronendonator ist Ascorbat zusammen mit Phenazinmethosulfat. Das pH Optimum liegt bei 5.2, die Reaktion wird durch EDTA nicht gehemmt und die Reaktionsgeschwindigkeit ist maximal bei 100 mbar NO Partialdruck. Das Enzym konnte durch Isolierung von Membranfraktionen um den Faktor 5.3 (bezogen auf den zellfreien Rohextrakt) angereichert werden. Die Solubilisierung von aktiver Reduktase aus den Membranvesikeln gelang bisher nicht.

Die nicht enzymatische NO-Reduktion wirkt sich störend auf Aktivitätsmessungen dissimilatorischer Nitrit- und NO-Reduktasen aus, da Ascorbat für viele der bisher untersuchten Systeme den effektivsten Elektronendonator darstellt. Im Fall der NO-Reduktase wird überhöhte Aktivität vorgetäuscht, im Fall der Nitritreduktase, Cytochrom cd, die scheinbar physiologische Produktion von  $\text{N}_2\text{O}$ .

Die Überlagerung enzymatischer NO-Reduktionen durch die Fe/Ascorbat abhängige Reaktion, bzw. die Ankopplung der chemischen NO-Reduktion an die physiologische NO Produktion kann durch die Blockierung des Fe/Ascorbat Systemes mit EDTA oder durch Messung der enzymatischen Reaktionen bei pH Werten im leicht sauren Bereich ausgeschlossen werden.

Für die Durchführung der kinetischen Untersuchungen wurde ein schaltbares Mehrsäulentrennsystem entwickelt, das die simultane Analyse von  $\text{O}_2$ ,  $\text{N}_2$ , NO und  $\text{N}_2\text{O}$  (zusammen mit  $\text{H}_2$ , CO und  $\text{CO}_2$ ) in Intervallen von weniger als 2.5 min ermöglicht.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Alefouder PR, Ferguson SJ (1982) Electron transport linked nitrous oxide synthesis and reduction by Paracoccus denitrificans monitored with an electrode. Biochem Bio-phys Res Commun 104: 1149 - 1155
- Allison FE (1966) The fate of nitrogen applied to soils. Adv Agron 18: 219 - 158
- Averill BA, Tiedje JM (1982) The chemical mechanism of microbial denitrification. FEBS Letters 138: 108 - 112
- Barbaree JM, Payne WJ (1967) Products of denitrification by a marine bacterium as revealed by gas chromatography. Mar Biol 1: 136 - 139
- Berger U (1961) Reduktion von Nitrat und Nitrit durch Neisseria. Z Hyg Infekt-Kr 148: 45 - 50
- Bonner FT, Pearsall KA (1982) Aqueous nitrosyliron(II) chemistry. 1. Reduction of nitrite and nitric oxide by iron(II) and (trioxodinitrato)iron(II) in acetate buffer. Intermediacy of nitrosyl hydride. Inorg Chem 21: 1973 - 1978
- Boogerd FC, van Verseveld HW, Stouthamer AH (1980) Electron transport to nitrous oxide in Paracoccus denitrificans. FEBS Letters 113: 279 - 284
- Bremner JM, Blackmer AM (1978) Nitrous oxide emission from soils during nitrification of fertilizer nitrogen. Science 199: 195 - 196
- Bremner JM, Blackmer AM (1981) Terrestrial nitrification as a source of atmospheric nitrous oxide. In: Delwiche CC (ed) Denitrification, nitrification and atmospheric nitrous oxide. Wiley & Sons, New York, pp 151 - 170
- Brimblecombe P, Stedman DH (1982) Historical evidence for a dramatic increase in the nitrate component of acid rain. Nature 298: 260 - 262
- Broadbent FE, Carlton AB (1978) Field trials with isotopically labeled nitrogen fertilizer. In: Nielsen DR, MacDonald JG (eds) Nitrogen in the environment. Vol 1. Academic Press, New York, pp 1 - 41
- Bryan BA (1981) Physiology and Biochemistry of denitrification. In: Delwiche CC (ed) Denitrification, nitrification, and atmospheric nitrous oxide. Wiley & Sons, New York, pp 67 - 84
- Chung CW, Najjar VA (1956) Cofactor requirements for enzymatic denitrification. II. Nitric oxide reductase. J Biol. Chem 218: 627 - 632

- Cox CD, Payne WJ, Dervartanian DV (1971) Electron paramagnetic resonance studies on the nature of hemoproteins in nitrite and nitric oxide reduction. *Biochim Biophys Acta* 253: 290 - 294
- Cox CD, Payne WJ (1973) Separation of soluble denitrifying enzymes and cytochromes from Pseudomonas perfectomarinus. *Can J Microbiol* 19: 861 - 872
- Crutzen PJ (1981) Atmospheric chemical processes of the oxides of nitrogen, including nitrous oxide. In: Delwiche CC (ed) Denitrification, nitrification, and atmospheric nitrous oxide. Wiley & Sons, New York, pp 17 - 44
- DeGroot GM, Stouthamer AH (1970) Regulation of reductase formation in Proteus mirabilis. III. Influence of growth with azide and of haeme deficiency on nitrate reductase formation. *Biochim Biophys Acta* 208: 414 - 427
- Delwiche CC, Bryan BA (1976) Denitrification. *Ann Rev Microbiol* 30: 241 - 262
- Delwiche CC (1981) The nitrogen cycle and nitrous oxide. In: Delwiche CC (ed) Denitrification, nitrification, and atmospheric nitrous oxide. Wiley & Sons, New York pp 1 - 16
- Dietz RN (1968) Gas chromatographic determination of nitric oxide on treated molecular sieve. *Anal Chem* 40: 1576 - 1578
- Downey RJ, Nuner JH (1967) Induction of nitrate reductase under conditions of nitrogen depletion. *Life Sci* 6: 855 - 861
- Downey RJ (1966) Nitrate reductase and respiratory adaptation in Bacillus stearothermophilus. *J Bacteriol* 91: 634 - 641
- Dunstan RH, Kelley BC, Nicholas DJD (1982) Fixation of di-nitrogen derived from denitrification of nitrate in a photosynthetic bacterium, Rhodopseudomonas sphaeroides forma sp. denitrificans. *J Bacteriol* 150: 100 - 104
- Enoch HG, Lester RL (1974) The role of a novel cytochrome b-containing nitrate reductase and quinone in the in vitro reconstruction of formate-nitrate reductase activity of E. coli. *Biochem Biophys Res Commun* 61: 1234 - 1241
- Farre-Riu F, Guiochon G (1963) Fast analysis of gases by gas solid chromatography. *J Gas Chromatog* 1: 33
- Fewson CA, Nicholas DJD (1960) Utilization of nitric oxide by microorganisms and higher plants. *Nature* 188: 194 - 196

- Firestone MK, Firestone RB, Tiedje JM (1979) Nitric oxide as an intermediate in denitrification: Evidence from nitrogen-13 isotope exchange. *Biochem Biophys Res Commun* 91: 10 - 16
- Foerster G, Weis W, Staudinger H (1965) Messung der Elektronenspinresonanz an Semidehydroascorbinsäure. *Liebigs Ann Chem* 690: 166 - 169
- Forget P (1974) The bacterial nitrate reductases. Solubilization, purification and properties of the enzyme A of *E. coli* K 12. *Eur J Biochem* 42: 325 - 332
- Garber EAE, Hollocher TC (1981) 15-N tracer studies on the role of NO in denitrification. *J Biol Chem* 256: 5459 - 5465
- Gayon U, Dupetit F (1886) Recherches sur la reduction des nitrates par les infiniment petits. *Soc Sci Phys Bordeaux, Ser 3, 2*: 201 - 307
- Görg A, Postel W, Westermeier R (1979) Ultradünnschicht isoelektrische Fokussierung und Ultradünnschicht-Elektrophorese in Polyacrylamidgel auf Folie. *Labor Medizin* 2: 32 - 40
- Görg A, Postel W, Westermeier R, Gianazza E, Righetti PG (1980) Gradient electrophoresis, isoelectric focusing and two-dimensional techniques in horizontal, ultra-thin polyacrylamide layers. *J Biochem Biophys Meth* 3: 273 - 284
- Haddock BA, Jones WC (1977) Bacterial Respiration. *Bacteriol Rev* 41: 47 - 99
- Haddock BA, Kendall-Tobias MW (1975) Functional anaerobic electron transport linked to the reduction of nitrate and fumarate in membranes from *E. coli* as demonstrated by quenching of atebirin fluorescence. *Biochem J* 152: 655 - 659
- Hall KC, Dowdell RJ (1981) An iso-thermal gas chromatographic method for the simultaneous estimation of oxygen nitrous oxide and carbon dioxide content of gases in the soil. *J Chromatogr Sci* 19: 107 - 111
- Hardy RWF, Hawelka UD (1975) Nitrogen fixation research: A key to world food? *Science* 188: 633 - 643
- Hecker WC, Bell AT (1981) Gas chromatographic determination of gases formed in catalytic reduction of nitric oxide. *Anal Chem* 53: 817 - 820
- Hollis OL (1966) Separation of gaseous mixtures using porous polyaromatic polymer beads. *Anal Chem* 38: 309 - 316

- Horio T, Higashi T, Yamanaka T, Matsubara H, Okunuki K (1961) Purification and properties of cytochrome oxidase from Pseudomonas aeruginosa. J Biol Chem 236: 944 - 951
- Hutchinson BR (1973) Some highlights in the history of nitrous oxide. N Z Med J 77: 171 - 177
- Ingraham JL (1981) Microbiology and genetics of denitrification. In: Delwiche CC (ed) Denitrification, nitrification and atmospheric nitrous oxide. Wiley & Sons, New York, pp 45 - 64
- Ishaque M, Aleem MIH (1973) Intermediates of denitrification in the chemoautotroph Thiobacillus denitrificans. Arch Microbiol 94: 269 - 282
- Iwasaki H, Matsubara T (1971) Cytochrome c-557(551) and cytochrome cd of Alcaligenes faecalis. J Biochem 69: 847 - 857
- Iwasaki H, Matsubara T (1972) A nitrite reductase from Achromobacter cycloclastes. J Biochem 71: 645 - 652
- Iwasaki H, Saigo T, Matsubara T (1980) Copper as a controlling factor of anaerobic growth under  $N_2O$  and biosynthesis of  $N_2O$  reductase in denitrifying<sup>2</sup> bacteria. Plant Cell Physiol 21: 1573 - 1584
- Iwasaki H, Terai H (1982) Analysis of  $N_2$  and  $N_2O$  produced during growth of denitrifying bacteria in copper depleted and -supplemented media. J Gen Appl Microbiol 28: 189 - 193
- Jeffrey PG, Kipping PJ (1972) Gas analysis by gas chromatography. Pergamon Press, Oxford
- John P (1977) Aerobic and anaerobic bacterial respiration monitored by electrodes. J Gen Microbiol 98: 231 - 238
- Kaiser R (1973) Chromatographie in der Gasphase. Vol 1. Gaschromatographie. Bibliographisches Institut, Mannheim
- Kakutani T, Watanabe H, Arima K, Beppu T (1981) Purification and properties of a copper-containing nitrite reductase from a denitrifying bacterium, Alcaligenes faecalis strain S-6. J Biochem 89: 453 - 461
- Kaneko M, Ishimoto M (1978) A study on nitrate reductase from Propionibacterium acidipropionici. J Biochem 83: 191 - 200
- Kessler E (1971) Stoffwechsel anorganischer N-Verbindungen. Fortschr Bot 33: 95 - 103
- Knowles R (1982) Denitrification. Mikrobiol Rev 46: 43 - 70

- Kodama T, Shimada K, Mori T (1969) Studies on anaerobic bi-phasic growth of a denitrifying bacterium, Pseudomonas scutneri. Plant Cell Physiol 10: 865 - 866
- Kozaki I, Hattori A (1974) Energy yields of a denitrifying bacterium, Pseudomonas denitrificans, under anaerobic and denitrifying conditions. J Gen Microbiol 86: 1 - 10
- Kozaki I, Hattori A (1975a) Energy yields of denitrification in relation to growth yields in continuous cultures of Pseudomonas denitrificans under nitrate-, nitrite- and nitrous oxide-utilizing conditions. J Gen Microbiol 88: 11 - 19
- Kristjansson JG, Walzer B, Hollocher TC (1976) Respiration-dependent proton translocation and the transport of nitrate and nitrite in Paracoccus denitrificans and other denitrifying bacteria. Biochemistry 15: 5014 - 5019
- Kristjansson JG, Hollocher TC (1976) Microspectral assay for soluble nitrous oxide reductase of denitrifying bacteria and a partial kinetic characterization. J Biol Chem 251: 704 - 707
- Lau J, Nicholas DG (1969) A nitrite reductase with cytochrome oxidase activity from Micrococcus denitrificans. Biochim Biophys Acta 190: 439 - 447
- Leland J, Petersen G (1974) A rapid method for analyzing nitric oxide reduction products in a single sample. J Inorganic Sci 11: 343 - 346
- Leibel J, Payne WJ, Morlan W, Serfatian S (1974) On the purification of nitrite reductase from Thiobacillus denitrificans and its reaction with nitrite under reducing conditions. Biochim Biophys Res Commun 57: 355 - 360
- Levy IM, Greenberg M, Furr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 192: 197 - 213
- Matsubara T (1971) Studies on denitrification XII: Gas production from amines and nitrate. J Biochem 69: 147 - 150
- Matsubara T (1971) Studies on denitrification XIII: Some properties of the  $N_2O$ -anaerobically grown cell. J Biochem 69: 941 - 944
- Matsubara T (1975) The participation of cytochromes in the reduction of  $N_2O$  to  $N_2$  by a denitrifying bacterium. J Biochem 77: 607 - 609
- Matsubara T, Sanoike K, Doudt WJ (1987) Modulation by copper of the products of nitrite respiration in Pseudomonas perfectillanensis. J Bacteriol 149: 816 - 823
- Matsubara T, Iwasaki K (1977) Enzymatic steps of dissimilatory nitrite reduction in Alcaligenes faecalis. J Biochem 81: 886 - 888

- Matsubara T, Iwasaki H (1972) Nitric oxide reducing activity of Alcaligenes faecalis cytochrome cd. J Biochem 72: 57 - 64
- Matsubara T, Mori T (1968) Studies on denitrification IX: Nitrous oxide, its production and reduction to nitrogen. J Biochem 64: 863 - 871
- Matsubara T, Zumft WG (1982) Identification of a copper protein as part of the nitrous oxide-reducing system in nitrite-respiring (denitrifying) Pseudomonads. Arch Microbiol 132: 322 - 328
- MacGregor CH (1976) Biosynthesis of membrane-bound nitrate reductase in E. coli: Evidence for a soluble precursor. J Bacteriol 126: 122 - 131
- MacGregor CH, Schnaitman CA, Normansell DE, Hodgins MG (1974) Purification and properties of nitrate reductase from E. coli K 12. J Biol Chem 249: 5321 - 5327
- Melia TP (1965) Decomposition of nitric oxide at elevated pressures. J Inorg Nucl Chem 27: 95 - 98
- Miyata M (1971) Studies on denitrification XIV: The electron donating system in the reduction of nitric oxide and nitrate. J Biochem 70: 205 - 213
- Miyata M, Matsubara T, Mori T (1969) Studies on denitrification XI: Some properties of nitric oxide reductase. J Biochem 66: 759 - 765
- Miyata M, Mori T (1969) Studies on denitrification X: The "denitrifying enzyme" as a nitrite reductase and the electron donating system for denitrification. J Biochem 66: 463 - 471
- Newton N (1969) The two-haem nitrite reductase of Micrococcus denitrificans. Biochim Biophys Acta 185: 316 - 331
- Neyra CA, Döbereiner J, Lalonde R, Knowles R (1977) Denitrification by  $N_2$ -fixing Spirillum lipoferum. Can J Microbiol 23: 300 - 305
- Payne WJ (1973) Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. Bacteriol Rev 37: 409 - 452
- Payne WJ (1981) Denitrification. Wiley & Sons, New York
- Payne WJ, Riley PS, Cox CD (1971) Separate nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide reducing fractions from Pseudomonas perfectomarinus. J Bacteriol 106: 356 - 361
- Pearsall KA, Bonner FT (1982) Aqueous nitrosyliron(II) chemistry. 2. Kinetics and mechanism of nitric oxide reduction. The dinitrosyl complex. Inorg Chem 21: 1978 - 1985

- Pichinoty F, Azoulay E, Couchoud-Beaumont P, Le Minor L, Rigano C, Bigliardi-Rouvrier J, Piechaud M (1969) Recherche des nitrate-reductases A et B: Resultats. Ann Inst Pasteur 116: 27 - 42
- Pope JM, Stevens PR, Angotti MT, Nakon R (1980) Free metal ion depletion by "Good's" buffers. Anal Biochem. 103: 114 - 121
- Porte F, Vignais PM (1980) Electron transport chain and energy transduction in Paracoccus denitrificans under autotrophic growth conditions. Arch Microbiol 127: 1 - 10
- Reiling HE, Zuber H (1980) Energy production of Bacillus stearothermophilus by denitrification processes. Experientia 36: 1457 - 1458
- Renner ED, Becker GE (1970) Production of nitric oxide and nitrous oxide during denitrification by Corynebacterium nephridii. J Bacteriol 101: 821 - 826
- Rolston ED (1981) Nitrous oxide and nitrogen gas production in fertilizer loss. In: Delwiche CC (ed) Denitrification, nitrification, and atmospheric nitrous oxide. Wiley & Sons, New York
- Rolston DE, Hoffman DL, Toy DW (1978) Field measurement of denitrification. 1. Flux of  $N_2$  and  $N_2O$ . Soil Sci Soc Am J 42: 863 - 869
- Rowe JJ, Sherr BF, Payne WJ, Eagon RG (1977) A unique nitric oxide binding complex formed by denitrifying Pseudomonas aeruginosa. Biochem Biophys Res Commun 77: 253 - 258
- Satoh T, Hoshino Y, Kitamura H (1976) Rhodopseudomonas sphaeroides forma sp. denitrificans, a denitrifying strain as a subspecies of Rhodopseudomonas sphaeroides. Arch Microbiol 108: 265 - 269
- Sawada E, Satoh T, Kitamura H (1978) Purification and properties of a dissimilatory nitrite reductase of a denitrifying phototrophic bacterium. Plant Cell Physiol 19: 1339 - 1351
- Sawhney V, Nicholas DJD (1978) Sulphide-linked nitrite reductase from Thiobacillus denitrificans with cytochrome oxidase activity: Purification and properties. J Gen Microbiol 106: 119 - 128
- Schroeder ED (1981) Denitrification in wastewater management. In: Delwiche CC (ed) Denitrification, nitrification, and atmospheric nitrous oxide. Wiley & Sons, New York, pp 105 - 126
- Schulp JA, Stouthamer AH (1970) The influence of oxygen glucose and nitrate upon the formation of nitrate reductase and the respiratory system in Bacillus licheniformis. J Gen Microbiol 64: 195 - 203

- Shimada A, Orii Y (1976) Oxidation-reduction behavior of the heme-c and heme-d moieties of Pseudomonas aeruginosa nitrite reductase and the formation of an oxygenated intermediate at heme-d. J Biochem 80: 135 - 140
- Sidransky E, Walter B, Hollocher TC (1978) Studies on the differential inhibition by azide on the nitrite/nitrous oxide level of denitrification. Appl Environ Microbiol 35: 247 - 250
- Smith KA, Dowdell RJ (1973) Gas chromatographic analysis of the soil atmosphere: Automatic analysis of gas samples for O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, Ar, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O and C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> hydrocarbons. J Chromatogr Sci 11: 655 - 658
- Snell FT, Snell CT (1949) Colorimetric methods of analysis. Vol 2. Van Nostrand, New York
- St. John RT, Hollocher TC (1977) Nitrogen 15 tracer studies on the pathway of denitrification in Pseudomonas aeruginosa. J Biol Chem 252: 212 - 218
- Stouthamer AH (1976) Biochemistry and genetics of nitrate reductase in bacteria. Adv Microb Physiol 14: 315 - 375
- Szulcowski DH, Higuchi T (1957) Gas chromatographic separations of some permanent gases on silica gel at reduced temperatures. Anal Chem 29: 1541 - 1543
- Thompson B (1977) Fundamentals of gas analysis by gas chromatography. Varian Associates Inc, Palo Alto
- Timmer-Ten Hoor A (1975) A new type of thiosulphate oxidizing, nitrate reducing microorganism: Thiomicrospira denitrificans sp. nov. Neth J Sea Res 9: 344 - 350
- Trowell JM (1965) Gas chromatographic separation of oxides of nitrogen. Anal Chem 37: 1152 - 1154
- Tunstall FIH (1970) The determination of gases evolved from propellant compositions by gas chromatography. Chromatographia 3: 411 - 413
- Udenfriend S, Clark CT, Axelrod J, Brodie BB (1954) Ascorbic acid in aromatic hydroxylation. A model system for aromatic hydroxylations. J Biol Chem 208: 731 - 739
- van Hartingsveldt J, Stouthamer AH (1974) Properties of a mutant of Pseudomonas aeruginosa affected in anaerobic growth. J Gen Microbiol 83: 303 - 310
- van Verseveld HW, Meijer EM, Stouthamer AH (1977) Energy conservation during nitrate respiration in Paracoccus denitrificans. Arch Microbiol 112: 17 - 23
- Visser CM (1980) Role of ascorbate in biological hydroxylations: Origin of life considerations and the nature of oxenoid species in oxygenase reactions. Bioorg Chem 9: 261 - 271

- Werber MM, Mevarech M (1978) Induction of a dissimilatory reduction pathway of nitrate in Halobacterium of the Death Sea. Arch Biochem Biophys 186: 60-65
- Wharton DC, Weintraub ST (1980) Identification of nitric oxide and nitrous oxide as products of nitrite reduction by Pseudomonas cytochrome oxidase (nitrite reductase). Biochem Biophys Res Commun 97: 236-242
- Wilhite EF, Hollis OL (1968) The use of porous polymer beads for analysis of the martian atmosphere. J G Chromatogr 6: 84-88
- Wijler J, Delwiche CC (1954) Investigations on the denitrifying process in soil. Plant Soil 5: 155-169
- Yamanaka T (1964) Identity of Pseudomonas cytochrome oxidase with Pseudomonas nitrite reductase. Nature 204: 253-255
- Yamanaka T, Kuimoto S, Okunuki K, Kusai K (1962) Preparation of crystalline Pseudomonas cytochrome oxidase and some of its properties. Nature 194: 759-760
- Yamanaka T, Ota A, Okunuki K (1962) Oxidative phosphorylation coupled with nitrate respiration. 1. Evidence for phosphorylation coupled with nitrate reduction in a cell-free extract of Pseudomonas aeruginosa. J Biochem 51: 253-258
- Yordy DM, Ruoff KL (1981) Dissimilatory nitrate reduction to ammonia. In: Delwiche CC (ed) Denitrification, nitrification, and atmospheric nitrous oxide. Wiley & Sons, New York, pp 171-190
- Yoshinari T, Knowles R (1976) Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. Biochem Biophys Res Commun 69: 705-710
- ZoBell CE, Upham HC (1944) A list of marine bacteria. Bull Scripps Inst Oceanogr 5: 239-292
- Zumft WG, Cárdenas J (1979) The inorganic biochemistry of nitrogen. Bioenergetic processes. Naturwissenschaften 66: 81-88
- Zumft WG, Frunzke K (1982) Discrimination of ascorbate-dependent nonenzymatic and enzymatic membrane-bound reduction of nitric oxide in denitrifying Pseudomonas perfectomarinus. Biochim Biophys Acta 681: 459-468
- Zumft WG, Matsubara T (1982) A novel kind of multi-copper protein as terminal oxidoreductase of nitrous oxide respiration in Pseudomonas perfectomarinus. FEBS Letters 148: 107-112

- Zumft WG, Sherr BF, Payne WJ (1979) A reappraisal of the nitric oxide binding protein of denitrifying Pseudomonas. Biochem Biophys Res Commun 88: 1230 - 1236
- Zumft WG, Vega JM (1979) Reduction of nitrite to nitrous oxide by a cytoplasmic membrane fraction from the marine denitrifier Pseudomonas perfectomarinus. Biochim Biophys Acta 548: 484 - 499



## Lebenslauf

Kurt Friedrich Frunzke

|               |                                                                                                                                                                                                        |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| geboren       | 7.2.1952 in Erlangen als erstes Kind des Ehepaares Karlheinz Frunzke (Volksschullehrer) und Katharina Frunzke, geb. Sänger                                                                             |
| Volksschule   | September 1958 bis Juli 1962 in Vestenbergsgreuth (Mfr.)                                                                                                                                               |
| Gymnasium     | September 1962 bis Juni 1971 Besuch des Math. nat. Gymnasiums in Höchstadt/Aisch                                                                                                                       |
| Abitur        | Juni 1971 in Höchstadt/Aisch                                                                                                                                                                           |
| Studium       | WS 1971/72 bis SS 1978 an der Friedrich Alexander Universität in Erlangen Studium der Biologie und Chemie für das Lehramt an Gymnasien                                                                 |
| Examensarbeit | Mai 1975 bis Dezember 1976 am Institut für Organische Chemie unter Anleitung von Prof. Dr. K. Geibel über das Thema: Darstellung und stereochemische Untersuchung von 2-Benzylidenbicyclo [3.2.1]octan |
| Examen        | Juni 1978 Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien in den Fächern Biologie und Chemie                                                                                                                 |

Die vorliegende Arbeit wurde vom Januar 1979 bis August 1982 am Institut für Botanik und Pharmazeutische Biologie der Universität Erlangen und ab September 1982 am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität (TH) Karlsruhe unter Anleitung von Prof. Dr. W. Zumft angefertigt.









